

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Apothekerin Stephanie Nobmann
aus Freiburg

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Juli 2001

ISOLIERTE GEHIRN-KAPILLAREN
ALS *IN VITRO*-MODELL DER BLUT-HIRN SCHRANKE

Gutachter:

Prof. Dr. Gert Fricker

Prof. Dr. Helga Möller

Meinen Eltern und Kian

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Fricker danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, für seine stete Ansprechbarkeit, für seine wertvollen Anregungen sowie für das Gewähren von ausreichend wissenschaftlichem Freiraum zum selbständigen Arbeiten.

Frau Prof. Dr. Möller danke ich für das Anfertigen des zweiten Gutachtens.

Frau Dr. Dillmann-Marschner danke ich besonders für ihre steten Aufmunterungen gerade zu Beginn der Promotion und für die geduldige Einführung in die Aufgaben einer Praktikums-Assistentin.

Ich danke der Firma Novartis (Basel, Schweiz) für die Überlassung von Octreotid, PSC 833 und Cyclosporin A.

Darüber hinaus möchte ich all denjenigen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Frau Katrin Kälkert für ihren treuen Beistand während der Versuche am konfokalen Laser-Mikroskop sowie ihre liebe Freundschaft.
- Frau Dr. Susanne Hoffmann-Ruoff (Sumi) für die gemütlichen Stunden unter einem Dach, für ihre liebe Freundschaft und die steten Aufmunterungen.
- Herrn Karl Werner für die stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung (nicht nur in Computer-Angelegenheiten) sowie für die freundliche Atmosphäre im Labor.
- Herrn Christoph Groebel sowie Herrn Tilo Schönbrodt für die Ergreifung Erster Hilfe-Maßnahmen beim Umgang mit Computern und Laptops meinerseits.
- Dr. Martin Bultmann für den freundschaftlichen Umgang mit mir als Kollegin sowie als „Vorgesetzter“ im Praktikum.
- Dr. Frank Lintz für die informativen und unterhaltsamen Einführungen in die Welt außerhalb Freiburgs sowie süd-östlich Deutschlands.
- Allen ehemaligen und derzeitigen Kollegen und Mitarbeitern an unserem Institut, die dazubeigetragen haben, daß die Zeit der Promotion eine unvergessliche und schöne war.

Ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, die mir das Studium und die Promotion ermöglicht haben. Außerdem für ihre Unterstützung bei der unermüdlichen Suche nach Rechtschreibfehlern.

Besonders danke ich auch meinem Freund Kian Tauser für seine seelische und moralische Unterstützung beim Entstehen dieser Arbeit.

Teile dieser Arbeit wurden vorgetragen oder veröffentlicht:

S. Nobmann, H. Gutmann, M. Török, J. Drewe, D.S. Miller, G. Fricker
„Xenobiotic transport across isolated functionally intact brain capillaries“
Pharmakologietagung Mainz, 2000
N.-S. Arch. Pharmacol., Suppl. 361 (4), 2000

D.S. Miller, S. Nobmann, H. Gutmann, M. Török, J. Drewe, G. Fricker,
„Xenobiotic transport in isolated brain microvessels studied by confocal microscopy“
Mol. Pharmacol. 58 (6), 2000, S. 1357-1367

S. Nobmann, B. Bauer, G. Fricker
„Ivermectin excretion by isolated functionally intact brain endothelial capillaries“
Brit. J. Pharmacol. 132 (3), 2001, S. 722-728

B. Bauer, S. Nobmann; D.S. Miller, G. Fricker,
„Transport of Paclitaxel in isolated functionally intact brain microvessels and cultured brain
capillary endothelial cells“
Pharmakologietagung Mainz 2001
N.-S. Arch. Pharmacol., Suppl. 363 (4), 2001

Weitere Veröffentlichungen:

M. Thöle, S. Nobmann, B. Bauer, J. Huwyler, G. Fricker
„Drug delivery across brain endothelium by liposomal conjugates“
Jahrestagung der AAPS, San Francisco 1998
PharmSciSupplemet, 1 (1), 1998, S. 379

M. Thöle, S. Nobmann, B. Bauer, J. Huwyler, G. Fricker
„Drug delivery across cerebral capillary endothelial cells by liposomal conjugates“
Jahrestagung der CRS German Local Chapter, Erlangen 1999

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Die Blut-Hirn Schranke.....	1
1.1.1	Geschichte	1
1.1.2	Morphologische und anatomische Besonderheiten an der Blut-Hirn Schranke ...	3
1.1.3	Transportprozesse an der Blut-Hirn Schranke	5
1.2	Arzneistoff-Transport ins zentrale Nervensystem (ZNS)	
	- Modelle der Blut-Hirn Schranke.....	7
1.2.1	<i>In vivo</i> -Modelle	7
1.2.1.1	<i>Indicator diffusion</i> Technik	7
1.2.1.2	<i>Brain uptake</i> Index	8
1.2.1.3	<i>Brain efflux</i> Index	8
1.2.1.4	Gehirnperfusion.....	8
1.2.1.5	<i>Capillary depletion</i> Methode.....	9
1.2.1.6	Mikrodialyse.....	9
1.2.2	<i>In vitro</i> -Modelle.....	10
1.2.2.1	Zellkulturen	10
1.2.2.1.1	Primärkultur aus isolierten Gehirn-Kapillar-Endothelzellen.....	10
1.2.2.1.2	Zell-Linien.....	11
1.2.2.2	Isolierte Kapillaren	12
1.3	Zielsetzung der Arbeit.....	13
2	MATERIALIEN UND METHODEN.....	15
2.1	Substanzen	15
2.1.1	Verwendete Antikörper	15
2.1.2	Fluoreszierende Substanzen.....	15
2.1.3	Weitere Substanzen für Sekretionsversuche	15
2.2	Methoden.....	16
2.2.1	Isolierung der Kapillaren	16
2.2.2	Charakterisierung anhand spezifischer Endothelzell-Marker.....	18
2.2.2.1	vWF Färbung.....	18
2.2.2.2	Bestimmung der Aktivität der γ -GT	18
2.2.2.3	Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase	19
2.2.2.4	Proteinbestimmung.....	19

2.2.3	Exprimierung der Transportproteine.....	19
2.2.3.1	Immunfärbungen	19
2.2.3.2	Western Blot.....	20
2.2.3.2.1	P-Glykoprotein	21
2.2.3.2.2	Mrp2.....	23
2.2.4	Isolierung von Brush-border-Membranen	24
2.2.5	Immunfärbung mit einem GFAP-Antikörper.....	24
2.2.6	Sekretionsversuche am konfokalen Lasermikroskop	24
2.2.6.1	Durchführung der Versuche	25
2.2.6.2	Auswertung	26
2.2.7	Konfokale Laser <i>scanning</i> Mikroskopie (CLSM).....	26
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	28
3.1	Isolierung der Kapillaren.....	28
3.1.1	Überblick zur Entwicklung der Isolierungstechniken	28
3.1.2	Getestete Kapillar-Isolierungstechniken	29
3.1.3	Isolierung der Kapillaren nach einer Methode von Pardridge.....	31
3.2	Charakterisierung der isolierten Kapillaren	31
3.2.1	Morphologisches Erscheinungsbild	32
3.2.2	Inkubation mit FITC-Dextran 4000	32
3.2.3	GFAP-Färbung	32
3.2.4	vWF-Färbung	34
3.2.5	Alkalische Phosphatase Anreicherung.....	35
3.2.6	γ -Glutamyl-Transpeptidase Anreicherung	38
3.3	Exprimierung der ABC-Transporter P-Glykoprotein und Mrp2 in isolierten Kapillaren.....	40
3.3.1	ABC-Transporter.....	40
3.3.2	P-Glykoprotein	41
3.3.2.1	Allgemeines zu P-Glykoprotein.....	41
3.3.2.2	P-Glykoprotein Färbung	44
3.3.2.3	Western Blot auf P-Glykoprotein	46
3.3.2.4	Sekretionsversuche an isolierten Kapillaren	47
3.3.3	Multidrug resistance-related protein 2 - Mrp2	50
3.3.3.1	Allgemeines zu MRP.....	50
3.3.3.2	Immunfärbung von Mrp2	55
3.3.3.3	Western Blot.....	56

3.3.3.4	Sekretionsversuche am CLM.....	57
3.4	Einfluss von P-Glykoprotein und/oder Mrp2 auf den Transport von Ivermectin an der Blut-Hirn Schranke	64
3.4.1	Grundlegendes zu Ivermectin	64
3.4.2	Sekretionsversuche am CLM.....	66
3.4.3	Schlußfolgerung	72
3.5	Einfluss von P-Glykoprotein und/oder Mrp2 auf den Transport von Octreotid an der Blut-Hirn Schranke	73
3.5.1	Grundlegendes zu Octreotid	73
3.5.2	Sekretionsversuche am CLM.....	76
3.5.3	Schlußfolgerung	81
4	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	83
5	ANHANG	85
6	LITERATURVERZEICHNIS	93

Abkürzungen

γ -GT	γ -Glutamyl-Transpeptidase
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
BCEC	Gehirn-Kapillar-Endothelzellen (<i>brain capillary endothelial cells</i>)
BEI	<i>brain efflux index</i>
BSA	Rinder Serum Albumin
BUI	<i>brain uptake index</i>
ca.	circa
CLSM	konfokale Laser <i>scanning</i> Mikroskopie
COMT	Catechyl-o-methyl-Transferasen
CSA	Cyclosporin A
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
CSFT	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FITC	Fluoreszein Isothiocyanat
Fl-Mtx	Fluoreszein-Methotrexat
g	Einheit der Erdbeschleunigung
GH	Wachstumshormon (<i>growth hormone</i>)
GSH	Glutathion
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
IgG	Immunglobulin G
Ivermec.	Ivermectin
kDa	kilo Dalton
Kon.	Kontrolle
Loper.	Loperamid
LTC ₄	Leukotrien C ₄
mA	Einheit der elektrischen Stromstärke: Milliampere

Mab	Monoklonaler Antikörper
mV	Einheit der elektrischen Spannung: Millivolt
MAO	Monoaminoxidase
MDR	<i>multidrug resistance</i>
min	Minute
Mrp	<i>multidrug resistance-associated/related protein</i>
NaOH	Natronlauge
NBD	4-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol
Octr.	Octreotid
PBS	isotonischer Phosphatpuffer pH 7,4 (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
Pgp	P-Glykoprotein
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
s.o.	siehe oben
SDS	Natriumdodekylsulfat
sek	Sekunde
SUR 1	Sulfonylharnstoff Rezeptor (<i>sulphonylurea receptor</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TI	Trypsin Inhibitor
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
TRITC	Tetramethylrhodamin B Isothiocyanat
TSH	thyreoidstimulierendes Hormon
u.a.	unter anderem
V ₁	Versuch 1
Verap.	Verapamil
vWF	von Willebrand-Faktor
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZNS	Zentrales Nervensystem

Dreibuchstabencode der Aminosäuren:

Ala	Alanin
Asn	Asparagin
Cys	Cystein
Gly	Glycin
Lys	Lysin
Phe	Phenylalanin
Ser	Serin
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan

1 EINLEITUNG

Die medizinische Forschung erweitert fortschreitend den Erkenntnisstand über Krankheitsbilder, die ihren Ursprung im Zentralnervensystem (ZNS) oder Auswirkungen darauf haben. Dies sind beispielsweise Gehirntumore und auch die Alzheimer'sche und Parkinson'sche Krankheit, die in der geriatrischen Medizin zunehmend an Bedeutung gewinnen. Durch das wachsende Lebensalter unserer Bevölkerung nehmen ihre Häufigkeit und Schweregrade stetig zu. Um so wichtiger ist es, neben der Entwicklung neuer Arzneistoffe auch effektive Therapiemöglichkeiten zu entwerfen, um derartige Erkrankungen des ZNS gezielt therapieren zu können.

Hierbei steht man grundsätzlich vor dem Problem, daß (Arznei-) Stoffe auf dem Blutweg nur sehr eingeschränkt in das ZNS vordringen können, da dieses durch – im wesentlichen zwei – biologische Systeme wie durch Barrieren geschützt ist. Zum einen ist dies die Blut-Liquor Schranke zwischen Blut und Cerebrospinalflüssigkeit (CSF), und zum anderen die Blut-Hirn Schranke zwischen Blut und Gehirngewebe.

1.1 Die Blut-Hirn Schranke

1.1.1 Geschichte

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts führte der deutsche Pharmakologe und Physiologe Paul Ehrlich Experimente durch, die darauf hindeuteten, daß eine Barriere zwischen dem Gehirn und den nicht neuronalen Organen und Geweben existieren muß: Er stellte fest, daß ein intravenös verabreichter Farbstoff alle Gewebe der Versuchsratten anfärbte, mit Ausnahme des zentralen Nervensystems (ZNS). Ehrlich ging damals davon aus, daß dem Gehirngewebe essentielle Strukturmerkmale zum Binden des Farbstoffes fehlen würden (Ehrlich, 1985). Knapp 20 Jahre später konnte Goldmann, ein Schüler von Ehrlich, die Experimente bestätigen. Nach einer intravenösen Injektion von Trypanblau untersuchte er das Gehirn der Versuchstiere genauer und stellte fest, daß der *Choroid plexus* merklich, das umliegende Gehirngewebe jedoch gar nicht angefärbt war (Goldmann, 1909). In weiteren Versuchen injizierte er Hunden und Hasen den Farbstoff diesmal subarachnoidal, also direkt in die Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) und fand nun Teile des ZNS gefärbt vor (Goldmann, 1913). Aufgrund dieser Versuche vermutete er, daß die CSF und der Choroid plexus zwar auf der einen Seite für den Transport von Nährstoffen ins ZNS verantwortlich sind, auf der anderen Seite aber auch eine Schrankenfunktion gegenüber solchen Substanzen ausüben, die ansonsten für das ZNS toxisch wären.

Walter und Spatz waren die ersten, die zu Beginn der dreißiger Jahre unabhängig voneinander zu dem Schluß kamen, daß man zwischen einer Blut-Hirn Schranke und einer Blut-CSF

Schranke unterscheiden muß: Sie vermuteten, daß der Fluß der CSF alleine den Gasaustausch im ZNS nur unzulänglich unterstützen würde (Walter, 1930; Spatz, 1933).

Dieser Rückschluß blieb jedoch lange unbeachtet. Erst 1946 gab es eine Veröffentlichung von Krogh, der ebenfalls von einer Blut-Hirn Schranke sprach und vermutete, daß Nährstoffe wahrscheinlich über aktive Transportprozesse an der Blut-Hirn Schranke ins ZNS hinein transportiert werden. Damals ging man noch davon aus, daß Glia-Zellen, die einen großen Teil der Oberfläche der neuronalen Kapillaren bedecken, die eigentliche Schrankenfunktion ausüben (Dempsey und Wislocki, 1955). Erst Versuche von Crone Mitte der sechziger Jahre deuteten an, daß die Kapillaren selber eine wichtige und funktionelle Rolle an der Blut-Hirn Schranke spielen (Crone, 1965). Er konnte zeigen, daß die von Pappenheimer zuvor aufgestellte Poren Theorie – nach der Substanzen über Poren durch periphere Kapillarmembranen transportiert werden (Pappenheimer et al., 1951) – auch für neuronale Kapillaren zutrifft. Versuche von Reese und Karnovsky (1967) sowie Brightman und Reese (1969) am Elektronenmikroskop bestätigten schließlich, daß die Endothelzellen der Gehirn-Kapillaren die eigentliche, anatomische Basis der Blut-Hirn Schranke bilden.

Die Blut-Hirn Schranke wird aus einem Netzwerk von Kapillaren gebildet, die – geformt aus den Endothelzellen – das Gehirn in einer Gesamtlänge von ca. 600 km und in einem durchschnittlichen Abstand von nur 40 µm durchziehen (Pardridge, 1996).

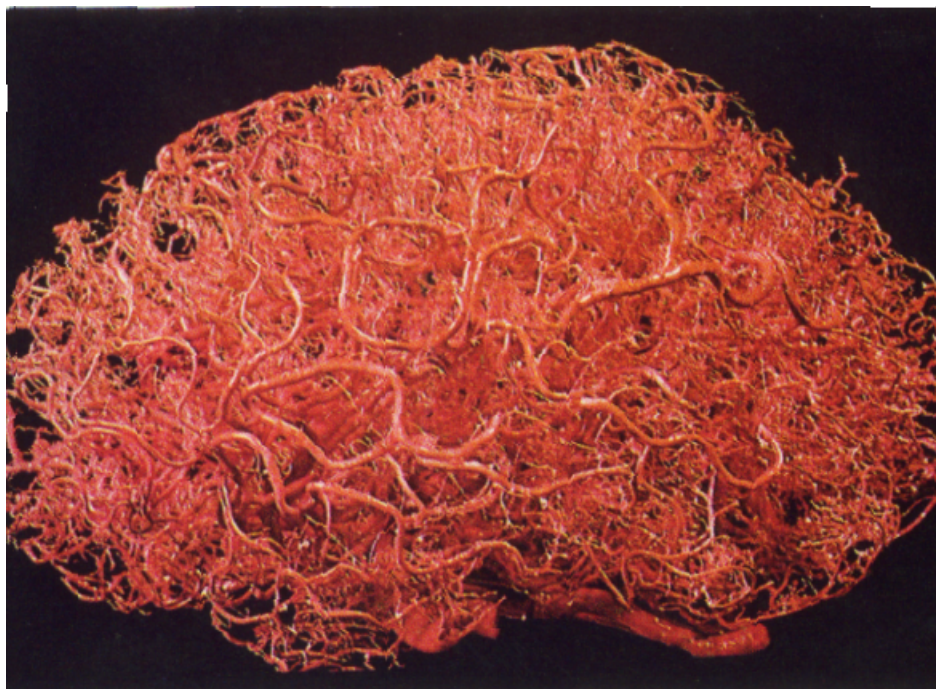


Abbildung 1: Kapillarsystem im Gehirn, entnommen aus Zlokovic und Apuzzo, 1998

1.1.2 Morphologische und anatomische Besonderheiten an der Blut-Hirn Schranke

Die besondere Funktion als Schranke ist nur dadurch möglich, daß die aus den Gehirn-Endothelzellen geformten Kapillaren sich in mehrfacher Hinsicht deutlich von den peripheren Kapillaren abgrenzen. Hierzu zählen neben metabolischen Besonderheiten insbesondere die morphologischen Unterschiede.

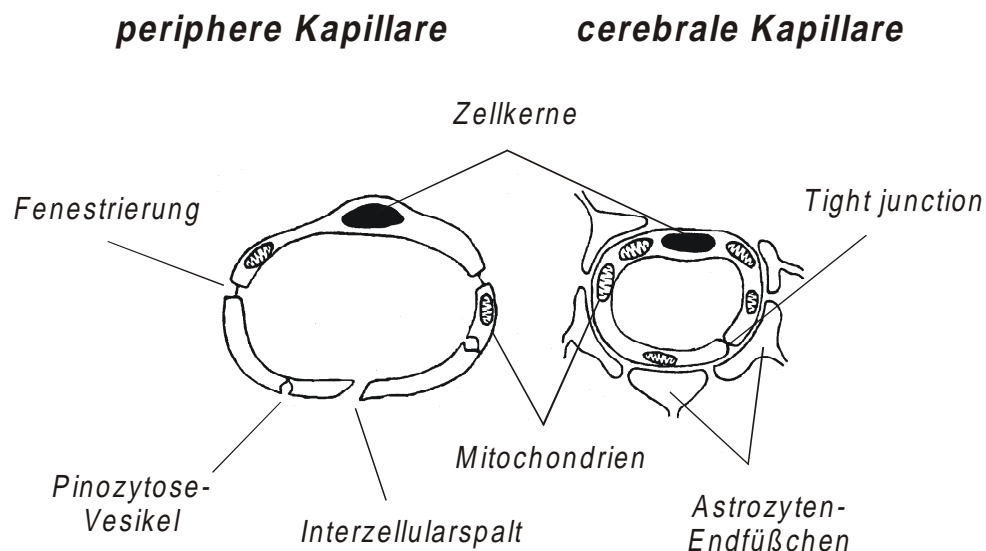


Abbildung 2: Eigenschaften der Endothelzellen einer Gehirnkapillare im Vergleich zu peripheren Endothelzellen, frei entnommen aus Reed et al., 1980

Das Endothel peripherer Kapillaren besitzt Fenestrierungen von ca. 50 µm Durchmesser, die einen nahezu freien Austausch von Wasser und gelösten Substanzen zwischen dem Blut und der extrazellulären Flüssigkeit des Gewebes ermöglichen. Die Endothelzellen an der Blut-Hirn Schranke haben keinerlei Fenestrierungen oder Zellularspalten (Lee, 1971).

Diese Endothelzellen sind vielmehr durch sehr dichte Zell-Zell Kontakte, sogenannte *tight junctions*, miteinander verbunden. Die *tight junctions* sind im Gegensatz zu den recht durchlässigen *gap junctions* oder gar Fenestrierungen der peripheren Endothelzellen ein wichtiges Charakteristikum der Blut-Hirn Schranke. Sie sind Teil eines hochdynamischen Systems, das – beeinflusst durch Bestandteile des Cytoskeletts – die parazelluläre Permeabilität der Gehirn-Endothelzellen für größere Moleküle stark einschränkt und dadurch einen wichtigen Beitrag zur Schrankenfunktion der Blut-Hirn Schranke leistet (Claude und Goodenough, 1973; Madara, 1988).

Die transzelluläre Passage von Molekülen zwischen Blut und Gehirn ist ebenfalls limitiert, da im Vergleich zu den peripheren Zellen die Anzahl der Pinozytose-Vesikel in den cerebralen Endothelzellen sehr gering ist (Cervos-Navarro, 1963).

Mitochondrien sind hingegen vergleichsweise sehr zahlreich zu finden. Dies deutet wiederum darauf hin, daß die Blut-Hirn Schranke eine hohe Stoffwechselaktivität aufweist und nicht nur als physikalische Barriere funktioniert (dichte *tight junctions*, geringe Anzahl an Pinozytose-Vesikeln), sondern auch eine metabolische oder enzymatische Barrierefunktion ausübt (Minn et al., 1991; Takakura, 1991). In der Membran der Kapillar-Endothelzellen ist der Gehalt an γ -Glutamyl-Transpeptidase, alkalischer Phosphatase und Glucose-6-phosphatase beispielsweise um ein vielfaches höher als in Parenchymzellen. Zugleich sind metabolisierende Enzyme wie z.B. die COMT, Monoaminoxidasen (MAO) oder auch Cytochrom P450 Enzyme vermehrt aktiv (Meresse et al., 1989; Perrin et al., 1990), so daß viele Substanzen noch vor oder während des intrazellulären Transportes metabolisiert werden.

Es gibt ebenso Hinweise darauf, daß außer den Kapillar-Endothelzellen noch weitere, benachbarte Zell-Typen an der Funktion der Blut-Hirn Schranke beteiligt sind. Zur Diskussion stehen insbesondere Astrozyten und Perizyten

In Abbildung 3 ist schematisch der Querschnitt einer Gehirn-Kapillare mit umliegenden Astrozyten-Endfüßchen, Perizyt und Basalmembran dargestellt.

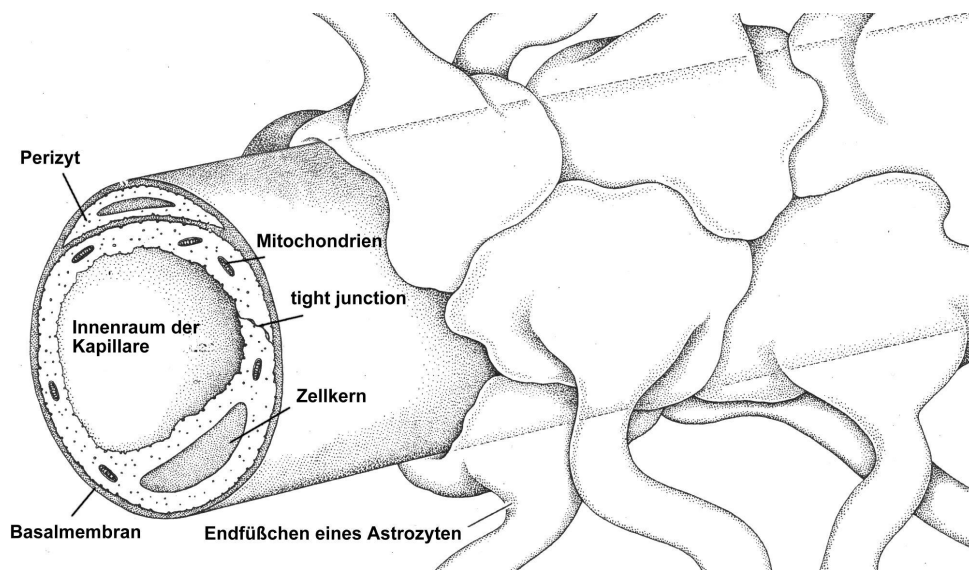


Abbildung 3: Schematische Darstellung einer Gehirn-Kapillare, entnommen aus Goldstein und Betz, 1986.

Die Perizyten sind spiralförmig um die Endothelzellen angeordnet, von diesen aber durch die Basalmembran getrennt. Ob und welche Funktion dieser Zelltyp an der Blut-Hirn Schranke besitzt, ist allerdings noch nicht bekannt.

Die Astrozyten (vgl. 3.2.3) sind Teil der Glia des zentralen Nervensystems, also des interstitiellen Gewebes zwischen den Nervenzellen und den Kapillaren. Über fußartige Ausläufer, die Astrozyten-Endfüßchen, treten sie mit den Kapillaren in Kontakt und bedecken

so ca. 80 % der Kapillaroberfläche. Sie sind aber wie die Perizyten ebenfalls noch durch die Basalmembran von den Kapillar-Endothelzellen getrennt (Thews et al., 1991). *In vitro* Studien deuten darauf hin, daß die Astrozyten selber zwar keine Barrierefunktion ausüben, aber z. B. über eine Beeinflussung der Dichte der *tight junctions* und der γ -Glutamyl-Transpeptidase Aktivität bei der Entwicklung und der Regulierung der Blut-Hirn Schranke Funktion eine Rolle spielen (Janzer und Raff, 1987; Arthur et al., 1987; Tao Cheng und Brightman, 1988).

In den letzten Jahren stellte sich zudem heraus, daß neben den morphologischen und enzymatischen Besonderheiten wie den dichten *tight junctions*, der fehlenden Fenestrierung, der geringen Pinozytoseaktivität oder der vermehrten Enzymaktivität auch sekretorische Exportproteine wie z.B. das P-Glykoprotein maßgeblich an der Funktion als Schranke beteiligt sind. Als *drug efflux*-Pumpe wirkt P-Glykoprotein in der Membran der Endothelzellen quasi wie ein „Rausschmeißer-Protein“, das das Gehirn vor toxischen Substanzen schützt (Cordon-Cardo et al., 1989; Schinkel et al., 1994; Jetté et al., 1993; vgl. auch 3.3.2.1)

Zusammen mit der Blut-Liquor Schranke hat die Blut-Hirn Schranke die Aufgabe das Gehirn auch unter kritischen Bedingungen in einem stabilen, nährstoffreichen Milieu zu halten (Spector und Johnson, 1989; Goldstein und Betz, 1986). Dies bedeutet zum einen, daß sie die Zufuhr von und Versorgung mit Nährstoffen, die für die geregelte Funktion des Gehirns nötig sind, gewährleistet, daß sie auf der anderen Seite aber auch das Gehirn vor dem Eintritt potentiell toxischer oder unnützer Moleküle schützt.

Hierzu stehen an der Blut-Hirn Schranke verschiedene Transportmechanismen zur Verfügung:

1.1.3 Transportprozesse an der Blut-Hirn Schranke

In Abbildung 4 sind schematisch die an der Blut-Hirn Schranke ablaufenden Transportprozesse dargestellt.

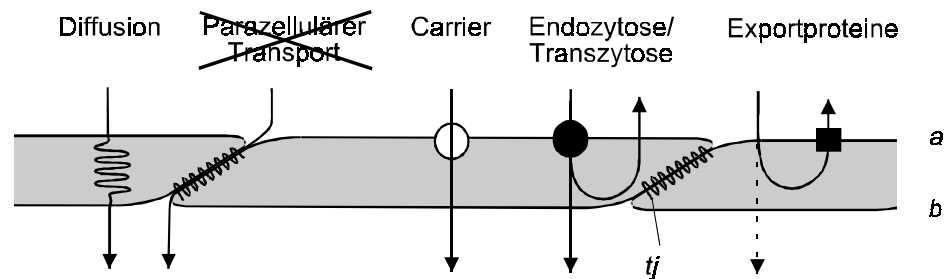


Abbildung 4: Transportprozesse an der Blut-Hirn Schranke (a: apikale Zellmembran (Lumenseite); b: basolaterale Zellmembran (Gehirnseite); tj: *tight junction*), entnommen aus Thöle, Dissertation 2000

Aufgrund der dichten *tight junctions* ist ein parazellulärer Transport nahezu ausgeschlossen.

Wasserlösliche Nährstoffe sowie Peptide werden daher in der Regel über Rezeptor- oder Absorption vermittelte Endo- bzw. Transzytose sowie spezifische Carriersysteme ins Gehirn aufgenommen. Durch Glukose-Transportproteine wird beispielsweise eine ausreichende und kontinuierliche Glukoseversorgung des Gehirns gewährleistet. Die Transportproteine für neutrale und basische Aminosäuren, monocarbozyklische Säuren sowie basische Amine wie auch viele weitere sichern die Zufuhr dieser (endogenen) Substanzen ins Gehirn (Terasaki und Tsuji, 1994; Tamai und Tsuji, 1996).

Im Gegensatz zu den wasserlöslichen Nährstoffen und Peptiden, passieren die meisten löslichen Substanzen einschließlich der Arzneistoffe die Blut-Hirn Schranke – wenn überhaupt – durch passive Diffusion und nicht durch spezifische Carrier- oder Rezeptor-vermittelte Systeme (Takakura et al., 1991). Aus *in vivo* Studien konnte hergeleitet werden, daß die Permeabilität dieser Moleküle über die Blut-Hirn Schranke in direktem Verhältnis zu ihrer Lipophilie steht und umgekehrt proportional ihrem Molekulargewicht ist (Oldendorf, 1974; Levin, 1980; Seelig et al., 1994).

In den letzten Jahren hat man zunehmend erkannt, daß auch Exportproteine bzw. sekretorische Transportproteine eine wichtige Rolle bei Transportprozessen an der Blut-Hirn Schranke spielen. Eine Vielzahl von Substanzen, die klein und lipophil genug wären, die Blut-Hirn Schranke durch Diffusion zu überwinden, zeigen eine ungewöhnlich geringe Permeabilität. Man fand heraus, daß diese Substanzen zwar zum Teil aus dem Blut in die Endothelzellen gelangen, dort aber sofort von diesen Exportproteinen erkannt und wieder aktiv aus der Zelle zurück ins Blut transportiert werden. Erstes bekannt gewordenes Transportprotein dieser Art war P-Glykoprotein, das vor allem durch Ausbildung einer Resistenz in Krebszellen auf sich aufmerksam machte, indem es den Arzneistoff umgehend wieder aus der Zelle hinaustransportierte. Hieraus entstand auch letztlich das Synonym *multidrug resistance protein* für P-Glykoprotein. Inzwischen wird aber auch über eine

Beteiligung der erst Anfang bzw. Mitte der neunziger Jahre bekannt gewordenen Familie der *multidrug resistance-associated* Proteine (MRPs) an der Blut-Hirn Schranke diskutiert.

Die Untersuchung eines möglichen Einflusses dieser zuletzt genannten sekretorischen Transportproteine (P-Glykoprotein und/oder MRPs) auf den Transport von Arzneistoffen über die Blut-Hirn Schranke mit Hilfe eines *in vitro*-Modells der Blut-Hirn Schranke waren Teil dieser Arbeit.

1.2 Arzneistoff-Transport ins zentrale Nervensystem (ZNS) - Modelle der Blut-Hirn Schranke

Im Laufe der Jahre wurden zahlreiche Techniken und Modelle entwickelt, um Transportprozesse an der Blut-Hirn Schranke untersuchen zu können. Generell lassen sich hierbei *in vivo* und *in vitro*-Modelle unterscheiden.

Zu den *in vivo*-Modellen zählen unter anderem die *indicator diffusion* Technik, der *brain uptake* Index (BUI), der *brain efflux* Index (BEI), die Gehirnperfusion, die Mikrodialyse und die *capillary depletion*-Methode. Als *in vitro*-Modelle stehen isolierte Kapillaren, sowie Zellkulturen aus isolierten Kapillar-Endothelzellen oder Zell-Linien zur Verfügung.

1.2.1 *In vivo*-Modelle

Das anfängliche Wissen um und über die Blut-Hirn Schranke erhielt man durch *in vivo* Experimente oder durch morphologische Untersuchungen *ex vivo* (van Bree et al., 1992). Im Vergleich zu den *in vitro*-Modellen besitzen die *in vivo*-Modelle historisch gesehen daher eine längere Geschichte.

1.2.1.1 *Indicator diffusion* Technik

Hierbei wird der Arzneistoff in den arteriellen Blutstrom appliziert und im Anschluß daran die Konzentration im venösen Rückfluß aus dem entsprechenden Organ oder Gewebe – hier das ZNS – gemessen. Aus der Konzentrationsabnahme im Vergleich zu einer Referenz, die selbst nicht in das Organ/Gewebe diffundieren kann, erhält man ein Extraktionsverhältnis, aus dem wiederum ein Permeabilitätskoeffizient für die untersuchte Substanz berechnet werden kann (Crone, 1963).

Obwohl die Verlässlichkeit dieser *indicator diffusion* Technik durch einige Weiterentwicklungen verbessert wurde, bleibt sie auf die Anwendung von Substanzen, die leicht in das Gehirn penetrieren können, beschränkt (van Bree et al., 1992).

1.2.1.2 *Brain uptake Index*

Eine Weiterentwicklung und Verbesserung der oben beschriebenen Methode ist der von Oldendorf entwickelte *brain uptake Index* (BUI; Oldendorf, 1970). Radioaktiv markierte Test- sowie Referenzsubstanz werden in die innere Carotisarterie injiziert. Nach ca. 5-15 sek wird das Testtier – in der Regel eine Ratte – decapitiert, das Gehirn entnommen und die Radioaktivität bzw. Konzentration beider Substanzen im Gehirn vermessen.

Aus dem Verhältnis von injizierter Menge und gemessener Konzentration im Gehirn sowohl der Test- als auch der Referenzsubstanz errechnet sich der BUI:

$$\text{BUI} = (C_{\text{brain}}/C_{\text{inj.}})_{\text{test}} / (C_{\text{brain}}/C_{\text{inj.}})_{\text{ref.}}$$

Aufgrund der kurzen Versuchszeit ist diese Methode jedoch für Substanzen, die sehr langsam in das Gehirn aufgenommen werden – in der Regel hydrophile Stoffe wie z.B. Peptide und Proteine – nicht geeignet. Lediglich Substanzen, die die Blut-Hirn Schranke schnell überwindenden, können untersucht werden (Fenstermacher et al., 1981).

1.2.1.3 *Brain efflux Index*

Diese Methode wurde erst in den letzten Jahren entwickelt. Sie dient der Charakterisierung des Effluxes einer Substanz über die Blut-Hirn Schranke (Kakee et al., 1995 und 1996; Tamai und Tsuji, 1996; Suzuki et al., 1997).

Hier werden Referenzsubstanz – ein nicht permeabler Marker, in der Regel radioaktiv markiertes Inulin – und Testsubstanz gleichzeitig mittels Microinjektion ins Gehirn injiziert. Nach einiger Zeit wird das Tier decapitiert und die Radioaktivität im ipsilateralen Gehirn vermessen.

Der *brain efflux Index* (BEI) berechnet sich hinterher aus dem relativen Prozentsatz der über die Blut-Hirn Schranke in das zirkulierende Blut eliminierten Testsubstanz verglichen mit der in das Gehirn injizierten Menge:

$$\text{BEI (\%)} = \{1 - [(C_{\text{test}}/C_{\text{ref.}})_{\text{Gehirn}} / (C_{\text{test}}/C_{\text{ref.}})_{\text{inj}}]\} \times 100$$

1.2.1.4 *Gehirnperfusion*

Die Perfusions-Technik wurde entwickelt, um während des Versuchs eine Metabolisierung der Testsubstanz im Blut zu vermeiden.

Hierbei wird eine Carotis-Arterie mit Medium, welches radioaktivmarkierte Testsubstanz enthält, perfundiert. Im Anschluß daran wird das Gehirn entnommen, homogenisiert und die Radioaktivität vermessen. Der Vorteil dieser Methode liegt im fehlenden Blutfluß, so daß zum einen die Zusammensetzung des Perfusates optimiert werden kann, vor allem aber, die Metabolisierung der Testsubstanz durch Blutbestandteile oder andere Gewebe als dem Gehirn minimiert wird (Tamai und Tsuji, 1996).

Insbesondere für die Anwendung an der Ratte und dem Meerschweinchen wurden *Carotis externa*-Perfusions-Techniken entwickelt (Takasato et al., 1984; Zlokovic et al., 1986).

Der Vorteil des Meerschweinchen-Modells liegt darin, daß die Carotis-Arterie anders als bei der Ratte zwischen dem Nacken und Gehirn nicht verzweigt ist. Es müssen demnach nicht umständlich und zeitaufwendig mehrere Arterien-Äste abgebunden werden, um die komplette Zuführung des Perfusates ins Gehirn zu gewährleisten. Beim Meerschweinchen können daher die entsprechenden Versuchsbedingungen, statt wie bei der Ratte nur für ca. 20 sek, während 30 min aufrecht erhalten werden (Zlokovic et al., 1986).

Obwohl die Perfusion der inneren Carotis-Arterie eine umfangreiche experimentelle Ausrüstung und Operation der Versuchstiere erfordert, hat sie doch den entscheidenden Vorteil, daß Transportprofile gerade solcher Substanzen untersucht werden können, die aufgrund ihrer metabolischen Instabilität und geringen Penetration ins ZNS, z.T. mit den vorher beschriebenen Methoden nicht untersucht werden können.

1.2.1.5 Capillary depletion Methode

Speziell für die Untersuchung des Transports von Makromolekülen an der Blut-Hirn Schranke via Transzytose entwickelten Triguero et al. 1990 eine kombinierte Methode aus Gehirnperfusion nach Takasato mit anschließender *capillary depletion*. Hierbei wird nach dem Perfusionsexperiment das Gehirn homogenisiert und mit einer Dextran-Dichte-Zentrifugation in Kapillaren (Pellet) und Hirngewebe (Überstand) aufgetrennt (Triguero et al., 1990).

Durch die Abtrennung der Kapillaren vom Hirngewebe ist es möglich, zwischen Transzytose der untersuchten Substanz ins Hirngewebe und einfacher Bindung der zirkulierenden Substanz an die Kapillar-Endothelzellen und/oder Endozytose in diese Zellen zu unterscheiden.

1.2.1.6 Mikrodialyse

Bei der intracerebralen Mikrodialyse wird ein Dialyse-Schlauch ins Gehirn des Versuchstieres implantiert und perfundiert. Im Anschluß an die Injektion der Testsubstanz werden Proben des Perfusates gesammelt und vermessen. Je nachdem wo der Schlauch im Gehirn implantiert wird, ist die Mikrodialyse vielseitig verwendbar und sind Untersuchungen unterschiedlicher Wege des Arzneistoff-Transport an der Blut-Hirn Schranke möglich. Beispiele hierfür sind Experimente zur Öffnung der Blut-Hirn Schranke nach Perfusion mit einer hypertonen Lösung (de Lange, 1995) oder Erstellungen von Konzentrations-Zeit Profilen von Arzneistoffen in der Extrazellular-Flüssigkeit, nachdem diese intravenös verabreicht wurden (de Lange, et al., 1994 und 1997). Mikrodialyse-Experimente wurden auch durchgeführt, um den Transport von Rhodamin 123 durch P-Glykoprotein oder eines Dynorphin ähnlichen

Peptids an der Blut-Hirn Schranke zu untersuchen (de Lange et al., 1995 und 1998; Terasaki, 1991).

1.2.2 *In vitro*-Modelle

Zu den *in vitro*-Modellen der Blut-Hirn Schranke zählen unter anderem verschiedene Zellkultur-Modelle und die isolierten Gehirn-Kapillaren.

Die Zellkulturen können wiederum in Primärkulturen und Zell-Linien unterteilt werden.

1.2.2.1 Zellkulturen

1.2.2.1.1 Primärkultur aus isolierten Gehirn-Kapillar-Endothelzellen

Nachdem sich herausgestellt hatte, daß die Gehirn-Kapillar-Endothelzellen mit ihren morphologischen und metabolischen Besonderheiten die Blut-Hirn Schranke bilden, versuchte man in der Folgezeit verschiedene *in vitro*-Modelle der Blut-Hirn Schranke zu etablieren.

Erste Ansätze für ein Modell auf der Basis von Primärkulturen finden sich bereits Ende der Siebziger Jahre (Panula et al., 1978; DeBault et al., 1979).

Prinzipiell werden für das Primärkultur-Modell zunächst die Gehirn-Kapillar-Endothelzellen (BCECs, *brain capillary endothelial cells*) aus den Gehirnen von beispielsweise Rindern, Schweinen, Ratten oder Menschen isoliert. Dies kann auf eine rein mechanische (Dehouck et al., 1990), eine kombiniert mechanisch-enzymatische (Bowman et al., 1981; Rubin et al., 1991) oder eine rein enzymatische Methode (Audus und Borchardt, 1986 und 1987), gefolgt von Filtrations- und Dichte-Zentrifugationsschritten geschehen. Anschließend werden die einzelnen Zellen bzw. isolierten Zellcluster auf unterschiedlich vorbehandelten Kulturgefäßen, als Simulation der Basalmembran, wieder zu einem konfluenten Monolayer herangezogen.

Je nachdem worauf die Zellen zu einem Monolayer kultiviert werden, ergibt sich im Anschluß die Möglichkeit zu unterschiedlichen Experimenttypen: Aufnahmeexperimente von Substanzen in die Endothelzellen können durchgeführt werden, wenn die BCECs in Kulturschalen gezüchtet werden. Werden die Endothelzellen hingegen auf feinpörsen Membranfiltern kultiviert, können Transportexperimente durchgeführt werden – entweder direkt in den Kulturgefäßen, oder in speziellen Diffusionskammern, in die die Filtermembran mit dem Monolayer eingespannt wird.

Die Ausbeute bzw. Zahl der nach der Isolierung erhaltenen Zellen hängt sehr stark von der verwendeten Spezies ab. Bei der Verwendung von Rinderhirn als Ausgangsmaterial können bis zu 100 Millionen Zellen pro Hirn isoliert werden. Ein Schweinehirn ergibt ca.

40 Millionen Zellen. Aus dem Gehirn von 40 Ratten lassen sich hingegen nur etwa 10-20 Millionen Zellen isolieren (Garberg, 1998; van Bree et al., 1992). Gewebe vom Menschen und anderen Primaten wurde zwar ebenfalls verwendet (Dorovini-Zis et al., 1991; Biegel et al., 1995), spielt aber aufgrund der geringen Verfügbarkeit eine eher untergeordnete Rolle.

Auch wenn das Gehirn von großen Tieren (Rind, Schwein) als Ausgangsmaterial verwendet wird und man pro Hirn eine recht hohe Zahl an isolierten Zellen erhält, erfordert eine Primärkultur jedoch immer eine häufige Isolierung des Zellmaterials. Dies ist nicht nur zeitaufwendig sondern auch teuer.

Ein weiterer, entscheidender Nachteil des Primärkultur-Modells ist, daß kultivierte und zu Monolayern gezüchtete Gehirn-Endothelzellen teilweise ein anderes Verhalten aufzeigen als frisch isolierte Zellen.

Wichtige Markerenzyme der Blut-Hirn Schranke wie die γ -Glutamyl-Transpeptidase (γ -GT) und die Alkalische Phosphatase (AP) werden in Kultur herunterreguliert (Goetz et al., 1985; Meyer et al., 1990; Mischek et al., 1989). Ferner ist der „von Willebrand Faktor“ (vWF) – ebenfalls ein Endothelzellmarker – in frisch isolierten Zellen nachweisbar, später in Kultur teils nicht mehr.

Wesentlich ist vor allem auch, daß bei der Kultivierung der Endothelzellen die *tight junctions* nicht mehr in dem Maße ausgebildet werden und dicht sind, wie es für die Blut-Hirn Schranke *in vivo* charakteristisch ist (Garberg, 1998; Takakura et al., 1991).

Als Alternative zu den häufigen und teuren, für Primärkulturen notwendigen, Isolierungen und insbesondere um einen Verlust charakteristischer Blut-Hirn Schranke Merkmale während der Kultur zu vermeiden, versuchte man, *in vitro*-Modelle auf der Grundlage von Zell-Linien zu etablieren.

1.2.2.1.2 Zell-Linien

Zell-Linien werden entweder durch Immortalisierung normaler Zellen oder aus Tumorzellen gewonnen. Gegenüber den primären Gehirn-Kapillar-Endothelzellen (BCECs) besitzen sie den entscheidenden Vorteil, daß man sie zum einen passagieren kann, wodurch sich die Zahl der zeitaufwendigen Isolierungen der Primärzellen verringern läßt. Zum anderen verändern sich ihre Eigenschaften während der Kultur nicht in dem Maße, wie die der kultivierten BCECs.

Bereits 1980 entwickelten Spatz et al. eine Zell-Linie aus Gehirn-Endothelzellen. Die erhaltene, passagierte Kultur zeigte zwar γ -GT- und AP-Aktivität, unter dem Elektronenmikroskop waren jedoch statt der für die Blut-Hirn Schranke markanten *tight junctions* lediglich *gap junctions* zu erkennen. Dieser Ansatz kam also nicht als *in vitro*-Modell in Frage.

DeBault et al. klonen 1981 Gehirn-Endothelzellen aus einer Primärkultur von Mäuse-Endothelzellen. Und eine inzwischen recht gut charakterisierte Zell-Linie sind die RBE4 Zellen, entstanden aus Ratten-Gehirn-Endothelzellen. Diese exprimieren sowohl γ -GT als auch AP sowie P-Glykoprotein, jedoch scheint auch diese Zell-Linie zu durchlässig zu sein, um als generelles *in vitro*-Modell der Blut-Hirn Schranke eingesetzt werden zu können (Garberg, 1998; Begley et al., 1996).

Eine weitere Ratten-Gehirn-Endothelzell-Linie sind die CR3 Zellen, sie zeigen jedoch keine spontane Expressierung von γ -GT oder P-Glykoprotein (Lechardeur et al., 1995b).

Eine vom Schwein abgeleitete Zell-Linie sind die PBMEC/C1-2 (Teifel und Friedel, 1996), aber auch sie zeigen verminderte Aktivitäten von γ -GT und AP (Garberg, 1998).

Alles in allem zeigen auch die immortalisierten Zell-Linien Unterschiede bezüglich der Expressierung von Blut-Hirn Schranke Charakteristika und zeigen in der Regel eine höhere Permeabilität als die Blut-Hirn Schranke *in vivo* und Primärkulturen.

1.2.2.2 Isolierte Kapillaren

Neben den Zellkultur-Modellen stehen auch isolierte Kapillaren als *in vitro*-Modell der Blut-Hirn Schranke zur Verfügung.

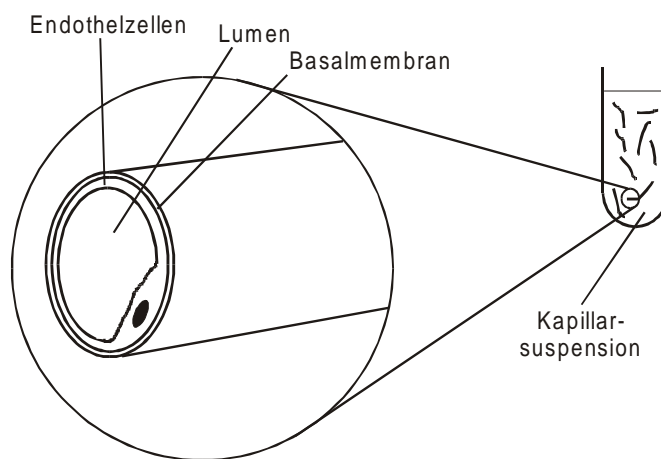


Abbildung 5: Schematische Darstellung isolierter Gehirn-Kapillaren in Suspension

Der Vorteil dieses Modells liegt darin, daß nicht erst der intakte Gewebeverband bei der Isolierung der einzelnen Endothelzellen zerstört wird, und anschließend die Zellen wieder in Kultur zu einem konfluenten Monolayer herangezüchtet werden müssen. Der Gewebeverband der Kapillaren bleibt bei diesem Modell intakt, ist also morphologisch der *in vivo* Situation sehr ähnlich (Boer und Breimer, 1996; Joó, 1985).

Ebenso entfällt der Nachteil, daß wichtige Charakteristika der Blut-Hirn Schranke – wie die Dichtigkeit der *tight junctions* und die Expressierung von Markern (γ -GT, AP, vWF) – während der Kultivierung nachteilig verändert werden. Denn auch wenn man versucht, die Dichtigkeit der *tight junctions* und die Aktivität von γ -GT und AP z.B. durch Co-Kultur mit anderen Zellen oder durch Verwendung von Astrozyten-konditioniertem Medium positiv zu beeinflussen, wird es die *in vivo* Situation immer nur annähernd widerspiegeln.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte insbesondere der Einfluß der Exportproteine (vgl. oben) auf den Transport von Arzneistoffen an der Blut-Hirn Schranke untersucht werden. In der Literatur finden sich jedoch Anzeichen, daß z.B. die funktionelle Expressierung von P-Glykoprotein in kultivierten Gehirn-Kapillar-Endothelzellen (BCECs) nicht nur von den jeweiligen Kulturbedingungen abhängt, sondern auch insgesamt schwächer ist als in frisch isolierten Kapillaren (Gaillard et al., 2000; Garberg, 1998; Lechardeur et al., 1997). So wiesen Gaillard et al. mittels Western Blot nach, daß Pgp in frisch isolierten Kapillaren sehr stark exprimiert wird, in kultivierten BCECs hingegen schwächer. Wurden die BCECs auf Filtern gezüchtet, konnten sie nur eine schwache Expressierung von Pgp feststellen, die jedoch durch Co-Kultivierung mit Astrozyten wieder merklich anstieg (Gaillard et al., 2000).

Lechardeur fand weiterhin, daß P-Glykoprotein in Kultur mit einem geringeren Molekulargewicht exprimiert wird. Er vermutete, daß Pgp unter Kulturbedingungen veränderte posttranslationale Modifikationen aufweist. (Lechardeur und Scherman, 1995).

Durch die Verwendung von frisch isolierten Kapillaren als *in vitro*-Modell wird eine mögliche Veränderung von P-Glykoprotein unter Kulturbedingungen oder gar ein eventuelles Herunterregulieren vermieden, so daß auch in diesem Punkt die isolierten Kapillaren der *in vivo*-Situation ähnlicher sind als Zellkultur-Modelle.

Für die Untersuchung von Transzytose Prozessen sowie für Aufnahme Studien eignen sich isolierte Gehirn-Kapillaren sicher weniger, da die zu untersuchende Substanz von der Gehirnseite aus, also der abluminalen/basolateralen und nicht wie unter *in vivo* Bedingungen von der luminalen Seite herkommt.

Sekretorische Prozesse, insbesondere die Untersuchung der Exportproteine an der Blut-Hirn Schranke können hingegen sehr gut untersucht werden, da sich der zu untersuchende Arzneistoff durch Sekretion im Lumen der Kapillare anreichern sollte.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, ein *in vitro*-Modell der Blut-Hirn Schranke zu erarbeiten, anhand dessen insbesondere der Einfluß von Exportproteinen auf den Transport von Arzneistoffen untersucht werden kann.

Zellkultur-Modelle, insbesondere die Primärkultur isolierter Gehirn-Kapillar-Endothelzellen, zeigen gerade im Hinblick auf die Expressierung dieser Transportproteine sowie einigen weiteren wichtigen Blut-Hirn Schranke Charakteristika einige Nachteile. Es sollte daher geprüft werden, ob frisch isolierte Gehirn-Kapillaren aus dem Schwein als *in vitro*-Modell zur Untersuchung dieser Fragestellung in Betracht kommen. Im Gegensatz zur Zellkultur sollten die Kapillaren nicht erst nach einem längeren Zeitraum der Kultivierung, sondern direkt nach der Isolierung in ihrem Verhalten frisch untersucht werden, um dadurch der *in vivo* Situation möglichst nahe zu kommen.

Dazu galt es zunächst einmal, morphologisch und funktionell intakte Kapillaren aus dem Gehirn von Schweinen zu isolieren, die über einen gewissen Zeitraum vital sind.

Ferner sollte gezeigt werden, daß diese isolierten Kapillaren die typischen Charakteristika der Blut-Hirn Schranke während der Isolierung nicht verloren haben. Hierbei ging es insbesondere um die Dichtigkeit der tight junctions, die Expressierung des Markerproteins „von Willebrand Faktor“ sowie der Aktivität der Markerenzyme γ -Glutamyl-Transpeptidase (γ -GT) und Alkalische Phosphatase (AP).

Im Folgenden sollte nachgewiesen werden, daß das Exportprotein P-Glykoprotein in den isolierten Kapillaren exprimiert wird und dort auch funktionell aktiv ist. Zudem sollte untersucht und gegebenenfalls eindeutig nachgewiesen werden, ob neben P-Glykoprotein auch noch weitere Exportproteine – z.B. Mitglieder der MRP-Familie, insbesondere Mrp2 – ebenfalls an der Blut-Hirn Schranke exprimiert werden und eventuell eine wichtige Rolle bei Transportprozessen von Arzneistoffen an der Blut-Hirn Schranke spielen.

Zuletzt sollten mittels isolierter Kapillaren als *in vitro*-Modell die zwei Arzneistoffe Ivermectin und Octreotid auf ihr Transportverhalten an der Blut-Hirn Schranke hin untersucht werden – insbesondere im Hinblick auf eine mögliche Beteiligung von P-Glykoprotein und/oder Mrp2.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Substanzen

2.1.1 Verwendete Antikörper

Anti-human von Willebrand Faktor, Isotyp rabbit	Sigma, Deisenhofen; Deutschland
anti-P-glycoprotein Mab (C219), Isotyp mouse IgG 2a	Alexis, Grüneberg; Deutschland
cMoat-Antiserum k13, aus dem Kaninchen	Dr. Peter Meier, Zürich; Schweiz
anti-cMOAT (human)(M ₂ III-6), Isotyp mouse IgG 2a	Alexis, Grüneberg; Deutschland
goat-anti-rabbit IgG, FITC-markiert	Sigma, Deisenhofen; Deutschland
sheep-anti-mouse IgG, FITC-markiert	Boehringer Mannheim; Deutschl.
rabbit-anti-mouse IgG, Meerrettich-Peroxidase gekoppelt	Dako, Glostrup; Dänemark
goat-anti-rabbit IgG, Meerrettich-Peroxidase gekoppelt	Dako, Glostrup; Dänemark
anti-glial-fibrillary acidic protein, Isotyp mouse	Sigma, Deisenhofen; Deutschland

2.1.2 Fluoreszierende Substanzen

Als fluoreszierende Substanzen für die Sekretionsversuche wurden verwendet:

Bodipy [®] -FL-Verapamil	Molecular Probes, Eugene, OR; USA
Bodipy [®] -FL-Ivermectin	Molecular Probes, Eugene, OR; USA
Fluoreszein-Methotrexat	Molecular Probes, Eugene, OR; USA
NBD-Octreotid	Novartis, Basel; Schweiz
FITC-Dextran 4000	Sigma, Deisenhofen; Deutschland

2.1.3 Weitere Substanzen für Sekretionsversuche

Als Substrate bzw. Inhibitoren für die Sekretionsversuche wurden folgende Substanzen verwendet:

Leukotrien C ₄ (LTC ₄)	Sigma, Deisenhofen; Deutschland
Natriumcyanid (NaCN)	Sigma, Deisenhofen; Deutschland
PSC 833	Novartis, Basel; Schweiz
Verapamil	Knoll AG, Ludwigshafen; Deutschland
Cyclosporin A (CSA)	Novartis, Basel; Schweiz
Octreotid	Novartis, Basel; Schweiz

SDZ 212 611	Novartis, Basel; Schweiz
Loperamid	Sigma, Deisenhofen; Deutschland
Ivermectin	Sigma, Deisenhofen; Deutschland

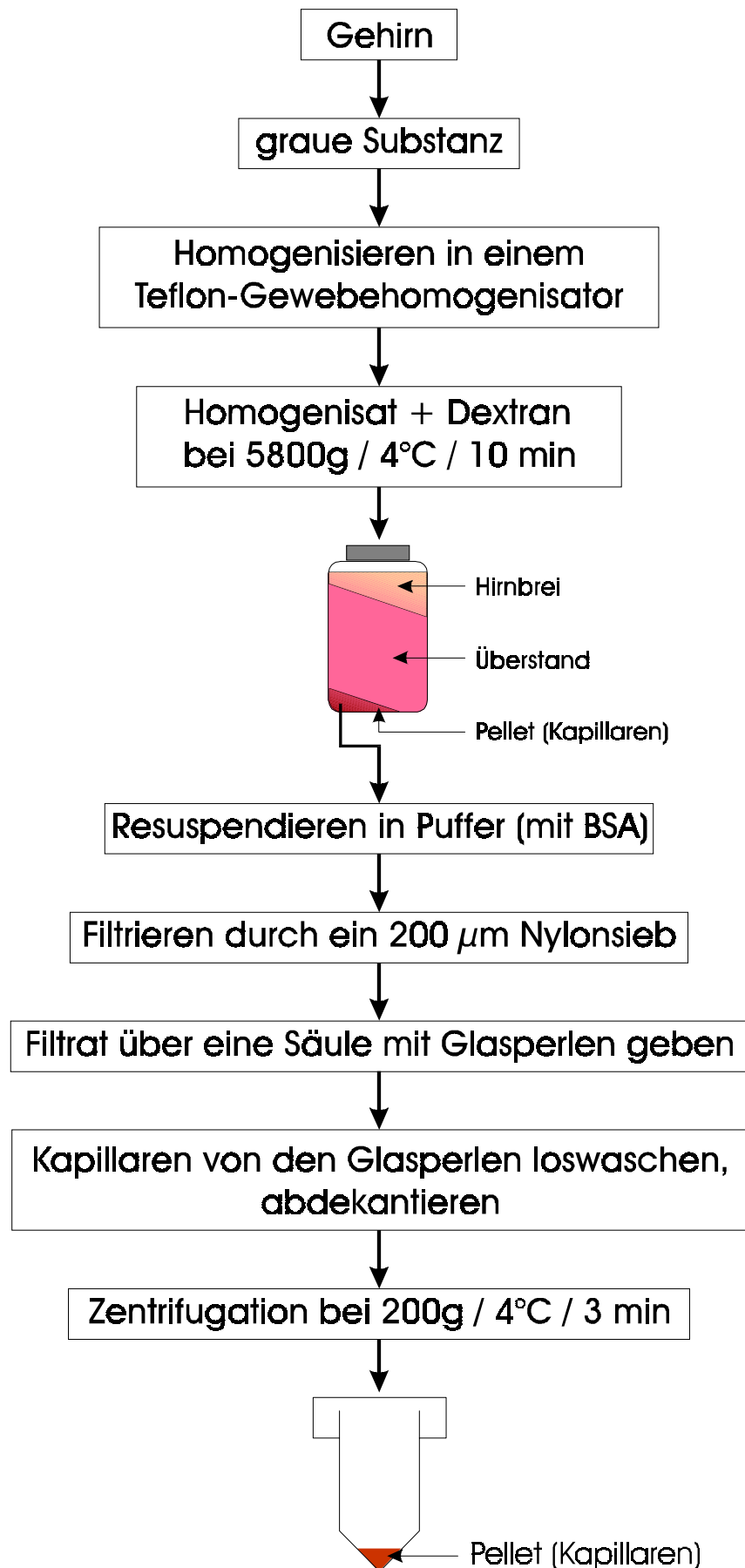
2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung der Kapillaren

Die Kapillaren wurden mittels einer rein mechanischen Methode in Anlehnung an Pardridge et al. (1985a) aus Schweinehirn (Schlachthof Mannheim) isoliert.

Je 4 frische Schweinehirnhälften wurden in kaltem Puffer A (103 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 1,2 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄, 15 mM HEPES, pH 7,4) vom Schlachthof auf Eis ins Labor transportiert, von den Hirnhäuten sorgfältig befreit und mit Puffer A gewaschen. Die graue Substanz wurde mit einem Skalpell vorsichtig abgeschabt, in ca. 1 mm² große Stücke zerteilt und anschließend mit dem ca. drei- bis fünffachen Volumen an Puffer A in einem Glashomogenisator (50 ml) mit Teflon-Pistill (Spaltbreite 0,25 mm) durch sechs drehenden Auf- und Abbewegungen homogenisiert. Das Endvolumen betrug 100 ml. Nach Zugabe des gleichen Volumens einer 30 %-igen Lösung von Dextran (Sigma) in Puffer A und Zentrifugation des Homogenats (Sorvall GSA-Rotor, 4 °C, 5800 g, 12 min) erhielt man 3 Schichten: ein kleines, rotes Pellet (= Kapillaren), eine trübe Lösung und den Überstand (= Gehirnbrei). Überstand und Lösung wurden abgesaugt, das verbleibende Kapillar-Pellet in 20-30 ml Puffer B (zusammengesetzt aus Puffer A, zusätzlich 25 mM NaHCO₃, 10 mM Glukose, 1 mM Na-pyruvat und 0,5 % (m/V) Rinder-Serumalbumin) resuspendiert und unter Nachspülen mit Puffer B durch eine Nylongaze der Maschenweite 200 µm (Polymon Gaze, NeoLab) filtriert. Hierbei wurden größere Gefäße und Gewebereste zurückgehalten, die Kapillaren konnten die Gaze jedoch passieren.

Zur Aufreinigung wurden die Kapillarsuspension anschließend über eine Glassäule (15 mm x 100 mm), gefüllt mit Glasperlen (Ø 0,45 mm bis 0,5 mm, B. Braun Biotech), gegeben. Am Ende der Glassäule war eine Nylongaze mit der Maschenweite 60 µm angebracht, sodaß beim Spülen mit ca. 600 ml Puffer B Zellbruchstücke und Erythrozyten herausgewaschen, die Kapillaren jedoch zwischen den Glasperlen festgehalten wurden. Zuletzt wurden die Glasperlen in ein Becherglas überführt. Die Kapillaren wurden durch vorsichtiges Rühren mit einem Glasstab wieder von den Glasperlen gelöst, und die Kapillarsuspension abdekantiert. Zum Entfernen des BSA wurden die Kapillaren abzentrifugiert (Beckmann Tischzentrifuge; 4 °C, 200 g, 5 min), mehrmals mit Puffer A gewaschen und zuletzt in 2 ml Puffer A resuspendiert.



Die Isolierung der Gehirn-Kapillaren aus Ratten erfolgte analog der oben beschriebenen Methode, lediglich mit folgenden Änderungen: Aufgrund der Gehirngröße wurde nicht nur die graue Substanz, sondern das gesamte Gehirn zweier Ratten verwendet. Nach Entfernen der Hirnhäute wurden diese in ca. 20 ml Puffer B mit 15 drehenden Auf- und Abbewegungen homogenisiert. Anschließend an die Dextran-Zentrifugation wurde das resuspendierte Kapillarpellet über eine Nylongaze der Maschenweite 85 μm (Büttner GmbH, Deutschland) gegeben. Beim Aufreinigungsschritt betrug die Maschenweite der für den Abschluß der Glassäule verwendeten Nylongaze 45 μm .

2.2.2 Charakterisierung anhand spezifischer Endothelzell-Marker

2.2.2.1 vWF Färbung

Der Nachweis des endothelspezifischen Markerproteins „von Willebrand-Faktor“ (vWF) erfolgte mittels einer Immunfärbung, wie sie unter 2.2.3.1. beschrieben wird, lediglich ohne den Zusatz von Propidiumjodid zum Anfärben der Zellkerne. Als primärer Antikörper wurde der „Anti-human von Willebrand Faktor“ (Sigma) 1:50 verdünnt eingesetzt, und als sekundärer Antikörper wurde ein „anti-rabbit IgG“, FITC-markiert (Sigma), ebenfalls 1:50 verdünnt, verwendet.

2.2.2.2 Bestimmung der Aktivität der γ -GT

Orlowski und Meister, 1963; Caspers und Diglio, 1984

Das Prinzip der Aktivitätsbestimmung der γ -Glutamyl-Transpeptidase (γ -GT) beruht darauf, daß L- γ -glutamyl-p-nitroanilid durch die γ -GT zu p-Nitroanilin umgesetzt wird, welches wiederum photometrisch bei 410 nm vermessen werden kann. Frisch isolierte Kapillaren bzw. Proben homogenisierter (Dounce Tissue Grinder) grauer Substanz, suspendiert in PBS, wurden mit dem gleichen Volumen einer 1%igen Triton-X 100 Lösung 15 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Anschließend wurden je 500 μl mit 500 μl γ -GT Reaktionsgemisch (20 mM MgCl_2 , 40 mM Glycylglycin, 530 μM L- γ -Glu-nitroanilid und 600 mM TRIS; pH 9) 40 min bei 37 °C in einem Thermomixer inkubiert. Nach Zugabe von 500 μl 3 N Essigsäure wurde kurz zentrifugiert (Mikrofuge Eppendorff; 1 min, 1000 g) und der Überstand wurde bei 410 nm spektralphotometrisch gegen den Blindwert (Puffer, γ -GT Reaktionsgemisch und Essigsäure) vermessen. Die Auswertung erfolgte mittels des molaren Absorptionskoeffizienten ($8800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Die so berechnete Enzymaktivität in U (Bildung von 1 nmol p-Nitroanilin pro Minute bei 37 °C) wurde auf mg Gesamtprotein (Bestimmung siehe 2.2.2.4) bezogen.

2.2.2.3 Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase

Bessey et al., 1946

Für die Aktivitätsbestimmung der Alkalischen Phosphatase (AP) wurde ein Reaktionskit der Firma Sigma Diagnostics (Produktnummer 104) verwendet. Hierbei wurde das Substrat p-Nitrophenylphosphat durch die AP zu p-Nitrophenol umgesetzt, welches wiederum bei 410 nm im Alkalischen vermessen werden kann. Als Standard für die Eichgerade dienten unterschiedliche p-Nitrophenol-Verdünnungen. Jeweils 100 µl Probe (p-Nitrophenollösung, frisch isolierte Kapillaren oder graue Substanz, suspendiert in PBS) wurden mit je 500 µl der auf 37 °C vortemperierten alkalischen Pufferlösung und Stock Substratlösung (beides Bestandteile des Sigmakits) vermischt und bei 37 °C für 15 min auf dem Thermomixer inkubiert. Zuletzt wurde der ganze Ansatz mit je 10 ml 0,05 N NaOH alkalisiert (Bildung von p-Nitrophenolat, gelb) und bei 410 nm photometrisch gegen den Blindwert vermessen. Nach Zugabe von 4 Tropfen konzentrierter Salzsäure wurde erneut die Absorption bestimmt, und dieser Wert vom ersten abgezogen. Die Enzymaktivität wurde zunächst in Sigma U/ml berechnet, wobei 1 Sigma Unit für die Freisetzung von 1 µmol p-Nitrophenol pro Stunde steht, anschließend wurden die Units auf mg Gesamtprotein (Bestimmung siehe 2.2.2.4) bezogen.

2.2.2.4 Proteinbestimmung

Bradford, 1976

Verwendet wurde hier der Proteinassay der Firma Biorad. Als Standard für die Erstellung der Eichgeraden dienten unterschiedlich konzentrierte Lösungen von Rinder-Serumalbumin (BSA) zwischen 3 µg und 21 µg. Je 50 µl Probe (BSA-Lösung, frisch isolierte Kapillaren oder graue Substanz suspendiert in Puffer) wurden mit 50 µl Eisessig und 1,5 ml des 1:5 mit Wasser verdünnten Proteinassay-Konzentrates versetzt und nach 5 min bei 595 nm spektral-photometrisch gegen den Blindwert vermessen.

2.2.3 Exprimierung der Transportproteine

2.2.3.1 Immunfärbungen

Für den immunhistochemischen Nachweis der Transportproteine wurden die Kapillaren mittels einer Zentrifuge mit Einsätzen für Objektträger (Labofuge GL, Heraeus) auf Glasobjektträger herunterzentrifugiert, fixiert, lysiert und anschließend mit den jeweils spezifischen Antikörpern und Propidiumjodid zum Anfärben der Zellkerne inkubiert.

Die Glasobjektträger wurden zuvor für 2 Stunden mit einer Poly-D-Lysin-Lösung (10 µg/ml; Sigma) beschichtet. 50-100 µl der Suspension von isolierten Kapillaren in Puffer (vgl. 2.2.1) wurde auf die Objektträger pipettiert, bei 200 g für 5 min herunterzentrifugiert und der

Überstand verworfen. Fixiert wurde mit einer Lösung aus 3 g Paraformaldehyd, 0,4 ml Glutardialdehyd 25 % und 3,4 g Saccharose in 100 ml PBS, pH 7,4 für 20 min bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen und erneutem Abzentrifugieren (200 g, 5 min) wurden die Kapillaren mit einer 1 %igen Triton-X 100 Lösung über 15 min bei Raumtemperatur lysiert, erneut abzentrifugiert und 3x gewaschen. Anschließend wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 150 µl einer Lösung aus spezifischem, primärem Antikörper und Propidiumjodid inkubiert, die unspezifischen Bindungsstellen wurden durch Zugabe von BSA geblockt und als Negativkontrolle wurde lediglich mit Propidiumjodid gefärbt. Für die Immunfärbung von P-Glykoprotein (Pgp) bestand die Lösung aus 1 µg/ml Propidiumjodid und dem 1:20 verdünnten primären, monoklonalen Pgp Antikörper C219 (Alexis, anti P-Glycoprotein Mab (C219), Isotyp mouse IgG 2a), sowie 2 % BSA. Für die Färbung von Mrp2 wurde zum einen ein monoklonaler Antikörper gegen Ratten cMoat (Antiserum K13 gegen die letzten 11 Aminosäuren von Mrp2, hergestellt im Kaninchen, freundlicherweise von Dr. Peter Meier, Universität Zürich, überlassen) 1:50 verdünnt verwendet, zum anderen ein monoklonaler Antikörper gegen cMoat/MRP2 von Alexis (monoclonal antibody to cMOAT (human) (M₂ III-6), Isotyp Mouse IgG2a), ebenfalls 1:50 verdünnt. Nach erneutem Abzentrifugieren und 4 maligem Waschen erfolgte eine Inkubation für 40 min bei Raumtemperatur mit den entsprechenden sekundären Antikörpern. Für Pgp war dies ein FITC-konjugierter anti-mouse-Ig Antikörper der Firma Boehringer Mannheim/Roche Biochemica, 1:50 verdünnt. Für Mrp2 wurde ein anti-rabbit IgG, ebenfalls FITC-markiert und 1:50 verdünnt (Sigma) bzw. der FITC-konjugierte anti-Maus-Ig Antikörper von Boehringer Mannheim/Roche verwendet. Nach Abzentrifugieren und mehrmaligem Waschen wurden die angefärbten Kapillaren in dem Eindeckmedium Vectashild[®] (mounting medium for fluorescence, Vector Laboratories) eingebettet, mit einem Deckglas bedeckt, mit Nagellack versiegelt und anschließend unter dem konfokalen Laser Mikroskop (Leica) mit der Methode FITC/TRITC betrachtet (vgl. 2.2.5.2).

2.2.3.2 Western Blot

Der Western Blot ist ein Verfahren, bei dem Proteine in einem elektrischen Feld durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose Membran übertragen (= geblottet) werden. Nach Blocken unspezifischer Bindungsstellen, kann im Anschluß daran das Protein mittels markierter, spezifischer Antikörper nachgewiesen werden.

Die SDS-Gelelektrophorese im Vorfeld dient dazu, die Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen: Proteine unterscheiden sich sowohl in der Ladung, als auch ihrer Größe und räumlichen Gestalt. Bei einer Auftrennung im elektrischen Feld mittels Gelelektrophorese überlagern sich alle drei physikalischen Parameter, eine Aussage über einen der Parameter –

z.B. das Molekulargewicht – ist nicht möglich. Bei der Behandlung der Proteine mit Natriumdodekylsulfat (SDS) lagern sich die lipophilen Molekülschwänze des SDS an die lipophilen, meistens nach innen gerichteten Bereiche des Proteinmoleküls an, während die hydrophilen Köpfchen nach außen zeigen. Im Endeffekt sind alle Proteine negativ geladen und besitzen eine einheitliche langgestreckte Form. Das Laufverhalten im Polyacrylamid-Gel wird jetzt nur noch durch die Molekülgröße bestimmt.

Für den Nachweis von P-Glykoprotein und Mrp2 in frisch isolierten Gehirn-Kapillaren mittels Western Blot wurde eine Gelelektrophorese- und Blotapparatur von Biorad (Mini Protean II) verwendet.

Als Molekulargewicht-Standard wurde eine vorgefertigte Mischung von Biorad (prestained SDS-Page standards, high range) verwendet. Brush-border Membranen aus Rattenduodenum dienten als Positiv Kontrolle sowohl für Pgp als auch Mrp2 (vgl. 2.2.4.3).

Als Trenngel wurde auf Grund der zu erwartenden Molekülgröße (190-170 kDa) ein 7,5 %iges Polyacrylamid-Gel gewählt. Das Sammelgel enthielt 4 % Polyacrylamid.

Um einen Abbau der Proteine durch Proteasen zu vermindern, wurde soweit möglich während der Probenaufarbeitung bei 4 °C bzw. unter Eiskühlung gearbeitet. Zudem wurden die zwei Protease-Inhibitoren PMSF (Phenylmethanolsulfonylfluorid) und Trypsin-Inhibitor verwendet.

Da sich sowohl die Probenaufarbeitung als auch die Durchführung der Gelelektrophorese für den Nachweis von P-Glykoprotein und Mrp2 unterscheiden, werden sie im Folgenden getrennt beschrieben.

2.2.3.2.1 P-Glykoprotein

SDS-Gelelektrophorese und Probenaufarbeitung:

Zunächst wurde das Trenngel mit 7,5 % Acrylamid gegossen: 3,75 ml eines Puffers bestehend aus 1,5 M TRIS pH 8,8 und 0,4 % Natriumdodecylsulfat (SDS, Sigma), 3,75 ml einer 30 %igen Acrylamidlösung, (hergestellt aus 29 Teilen Acrylamid, 1 Teil Bisacrylamid und 70 Teilen Wasser) sowie 7,5 ml Wasser wurden vermischt. Nach Zugabe von 150 µl einer 10 %igen Ammoniumpersulfatlösung (APS) und 15 µl TEMED (Sigma) als Starter wurde das Gel zügig in die Gießvorrichtung der Mini Protean II Zelle von Biorad gegossen und mit Wasser-gesättigtem Butanol überschichtet. Dies verhinderte während der Auspolymerisierungs-Phase ein Eintrocknen und Schrumpfen des Gels und führte nebenbei zu einer glatten Gießkante.

Anschließend ließ man das Gel für 45 min auspolymerisieren, saugte das Butanol ab und trug das Sammelgel auf. Das Sammelgel setzte sich aus 1,5 ml Puffer (0,5 M TRIS pH 6,8 und 0,4 % SDS), 1 ml 30 %ige Acrylamidlösung (s.o.), 5 ml Wasser, 100 µl 10 %iges APS und

10 µl TEMED zusammen und polymerisierte ca. 20 min aus. Währenddessen wurden die Proben vorbereitet und aufgetragen: die frisch isolierten Kapillaren wurden in einer eiskalten Lösung aus 10 ml PBS, 100 µl einer Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, Sigma)-Stocklösung (50 mM PMSF in Methanol) und 20 µl einer Trypsin Inhibitor (TI, Sigma)-Stocklösung (30 mg/ml in Wasser) resuspendiert und 2x je ca. 10-15 sek mit einem Ultra-Turrax homogenisiert. Nach dem Abzentrifugieren bei 700 g für 10 min wurde das Pellet erneut in PBS/PMSF/TI resuspendiert, sodaß man eine Proteinkonzentration von 1-2 µg/µl erhielt. Anschließend wurde alles für 20 min auf Eis ins Ultraschallbad gestellt. Je 35 µl Probe wurden mit 15 µl Probenpuffer vermischt und für 30-60 sek in einem 95 °C heißen Wasserbad erhitzt, wobei sich der wäßrige Probenpuffer aus 2 % SDS, 62,5 mM TRIS pH 6.8, 10 % Glycerin, 0,05 % Bromphenolblau und 5 % β-Mercaptoethanol (Fluka) zusammensetzte. β-Mercaptoethanol diente hierbei als reduzierendes Agens zum Brechen der Disulfid-Brücken. Die Apperatur mit den gegossenen Gelen wurde in eine mit Laufpuffer (25 mM TRIS pH 8.5, 193 mM Glycin, 0,1 % SDS in Wasser) gefüllte Kammer gestellt und die Proben mit Hilfe einer Hamilton Mikroliter Spritze auf das Gel aufgetragen. Von dem Standard wurden zwischen 10 µl und 15 µl aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde zu Beginn für ca. 20 min, bis die Proben das Trenngel erreicht hatten, mit einer konstanten Spannung von 80 V gefahren, anschließend wurde auf 150 V erhöht.

Blotten, Färben und Blocken:

Nachdem die Proteinfront das Ende des Gels erreicht hatte, wurde das Gel in die mit kaltem Blotting Puffer gefüllte Blotappatur (Mini Trans-Blot cell, Biorad) überführt. Der Blotting Puffer enthielt 25 mM TRIS pH 8,3, 193 mM Glycin und 20 % Methanol. Geblottet wurde auf eine Nitrozellulose-Membran (Transfer-Blot Transfer Medium, 0,45 µm, Biorad) mit einer konstanten Stromstärke von 250 mA für 2 ½ Stunden auf Eis. Zum Anfärben der Proteine wurde die Membran für 1 min in eine Amidoblack-Lösung (0,1 % Amidoblack, 20 % Methanol, 7,5 % Essigsäure) gelegt, und anschließend 3 mal für je 15 min in einer Lösung aus 20 % Methanol und 7,5 % Essigsäure wieder entfärbt. Unspezifische Bindungsstellen wurden über Nacht bei 4 °C mit einer Lösung aus 0,05 % Tween 20 in PBS (PBS/Tween) und 5 % Milchpulver geblockt.

Inkubation mit spezifischem Antikörper und Detektion mit ECL:

Nach Entfernen der Block-Lösung und dreimaligem Waschen für je 15 min in PBS/Tween wurde die Nitrozellulose-Membran für die Detektion von P-Glykoprotein mit dem Antikörper C219 (Mab C219, Alexis) für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Für die Inkubation wurde der primäre Antikörper 1:20 verdünnt in einer Lösung aus PBS/Tween, 1 % Milchpulver und 1 % BSA angewandt. Nach erneutem, dreimaligem Waschen für je 15 min in PBS/Tween wurde die Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden sekundären Antikörper inkubiert. Als Inkubationslösung verwendet wurde hierzu eine Lösung aus PBS/Tween

und 1% Milchpulver, in der der Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte sekundäre Antikörper (rabbit-anti-mouse IgG, Dako) 1:1000 verdünnt wurde. Nach Entfernen der Antikörper-Inkubationslösung und viermaligem Waschen konnte P-Glykoprotein anschließend mit dem Amersham ECL (enhanced chemiluminescence) Detektionskit detektiert werden, wobei in der Dunkelkammer auf einen Hyperfilm (Fuji Super RX 13 NIF) für ca. 15-60 sek belichtet und im Anschluß daran der Film entwickelt wurde.

2.2.3.2.2 Mrp2

SDS-Gelelektrophorese und Probenaufarbeitung:

Die Probenaufarbeitung wurde nach einer leicht modifizierten Methode durchgeführt, wie sie in Molecular cloning /3, J. Sambrook et al., beschrieben ist.

Die frisch isolierten Kapillaren wurden für den Nachweis von Mrp2 in einer eiskalten Lösung von PBS/PMSF/TI (s.o.) und 1 mM EDTA suspendiert, so daß man eine Proteinkonzentration von 1-2 µg/µl erhielt. Die Probe wurde 1:1 mit doppelt konzentriertem Probenpuffer (100 mM TRIS pH 6.8, 4 % SDS, 0,2 % Bromphenolblau, 20 % Glycerin, 10 % β-Mercaptoethanol) verdünnt und mit einem Ultra Turrax 10 sek homogenisiert. Nach 10 minütigem Erhitzen in einem kochenden Wasserbad und 15 min Ultraschallbehandlung wurde bei 10.000 g 10 min abzentrifugiert (Mikrofuge, Eppendorff) und der Überstand auf das Gel aufgetragen. Als Trenngel wurde erneut ein 7,5 %iges Acrylamid-SDS-Gel (vgl. 2.2.3.2.1) verwendet, diesmal aber nur mit 10 µl TEMED. Das Sammelgel wurde aus 5,5 ml Wasser, 1,3 ml 30 %ige Acrylamidlösung, 1 ml einer 1 M TRIS Lösung pH 6.8, je 80 µl einer 10 %igen SDS - und APS-Lösung, sowie 8 µl TEMED hergestellt/gegossen.

Die Elektrophorese wurde, wie für den Nachweis von P-Glykoprotein unter 2.2.3.2.1 bereits beschrieben, durchgeführt; der Laufpuffer bestand allerdings aus 25 mM TRIS pH 8.3, 250 mM Glycin und 0,1 % SDS.

Blotten, Färben und Blocken:

Dies wurde analog dem Nachweis von P-Glykoprotein durchgeführt.

Inkubation mit spezifischem Antikörper und Detektion mit ECL:

Für den Nachweis von Mrp2 wurden als primäre Antikörper der spezifische Mab M2 III-6 von Alexis (1:50), oder der polyklonale Antikörper k78-mrp2 (van Aubel et al., 1:200) jeweils verdünnt in Inkubationspuffer (PBS/Tween, 5 % Milchpulver, 1% BSA) verwendet. Als sekundärer Antikörper wurde wiederum der Meerrettich-Peroxidase gekoppelte rabbit-anti-mouse IgG bzw. goat-anti-rabbit IgG (jeweils 1:1000 verdünnt, vgl. 2.2.4.1.) eingesetzt. Detektion erfolgte wie für P-Glykoprotein mit dem ECL Detektionskit von Amersham.

2.2.4 Isolierung von Brush-border-Membranen

Als Positivkontrolle für P-Glykoprotein und Mrp2 im Western Blot wurden – wie von Schmitz et al., 1973, beschrieben – aus Rattenduodenum isolierte Brush-border-Membranen verwendet.

Die Därme zweier Ratten wurden in eine Lösung von 0,15 M NaCl, 10 mM TRIS/HEPES pH 7,5 (Lösung 1) gelegt. Stücke von ca. 5 cm Länge wurden mit einer Spritze gespült und mit einer Schere aufgeschnitten, so daß die Lumenseite nach außen zeigte. So konnte nun mit einem Objektträger die Mucosa abgeschabt werden. Diese wurde in einem Glashomogenisator (Dounce tissue blinder) in einer Lösung aus 50 mM Mannitol, 2 mM TRIS/HEPES pH 7,5 (Lösung 2) gesammelt (120 ml Gesamtvolumen) und durch sechsmalige Auf- und Abbewegungen homogenisiert. Dem Homogenat wurden langsam unter Rühren 1,2 ml einer 1 M CaCl_2 Lösung zugetropft, und die gesamte Suspension wurde für 40 min unter ständigem Rühren im Kühlschrank belassen. Nach Zentrifugation (Beckmann JA-20 Zentrifuge, 2000 g, 10 min und 4 °C) des mit CaCl_2 behandelten Homogenates wurde das Pellet verworfen und der Überstand erneut, diesmal für 20 min bei 35000 g und 4 °C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in der Lösung 2 resuspendiert, bei 27000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde diesmal in Lösung 1 resuspendiert, erneut für 30 min bei 35000 g abzentrifugiert und in Lösung 1 resuspendiert, so daß man letztlich eine Proteinkonzentration von ca. 1,3 µg/µl erhielt. Die Brush-border-Membranen wurden in einem Glashomogenisator durch zehnmalige Auf- und Abbewegungen homogenisiert, in Aliquots aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die Verwendung als Positivkontrolle im Western Blot wurden die Membranen wieder aufgetaut, zum Teil mit Lösung 1 verdünnt, mit doppelt konzentriertem Probenpuffer (vgl. 2.2.3.2.2.) im Verhältnis 1:1 vermischt und so auf das Gel aufgetragen.

2.2.5 Immunfärbung mit einem GFAP-Antikörper

Die immunhistochemische Anfärbung des „glial fibrillary acidic“ Proteins (GFAP) erfolgte analog der P-Glykoprotein-, Mrp2- und „von Willebrand-Faktor“-Färbung (vgl. 2.2.3.1). Als spezifischer, primärer Antikörper wurde der GFAP-Antikörper der Firma Sigma (monoclonal anti-glial-fibrillary acidic protein, Isotyp mouse) in einer 1:200 Verdünnung verwendet. Die Zellkerne wurden mit Propidiumjodid angefärbt. Anschließend wurde mit dem FITC-gekoppelten sekundären Antikörper (sheep-anti-mouse IgG, Boehringer Mannheim), 1:20 verdünnt, inkubiert.

2.2.6 Sekretionsversuche am konfokalen Lasermikroskop

Für einen weiteren Nachweis für das Vorhandensein der Transportproteine Pgp und Mrp2 in frisch isolierten Kapillaren wurden Sekretionsuntersuchungen am konfokalen Lasermikroskop

(CLM) durchgeführt. Analog dazu wurde auch eine mögliche Beteiligung von Pgp und/oder Mrp2 am Transport der zwei Arzneistoffe Ivermectin und Octreotid an der Blut-Hirn Schranke untersucht.

2.2.6.1 Durchführung der Versuche

Die frisch isolierten Kapillaren wurden in 2 ml eiskaltem und mit Carbogen (95 % O₂ / 5 % CO₂) begastem Transportpuffer suspendiert. Als Transportpuffer wurde eine Lösung aus 103 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄, 25 mM NaHCO₃, 5 mM Glukose, 1 mM Natriumpyruvat, und 2,5 mM CaCl₂, pH 7,4 verwendet.

Für die Inkubation mit den fluoreszierenden Substanzen und Inhibitoren wurden je 50 µl der suspendierten Kapillaren in Teflon - Inkubationskammern überführt. Die Kammern hatten entweder eine 4 x 4 cm (1 ml Versuchsvolumen) oder eine 2 x 2 cm (0,5 ml Versuchsvolumen) große Aussparung, die an der Unterseite mit einem Deckglässchen versehen war. Diese wurden vor dem Versuch zunächst für 2 Stunden mit einer Poly-D-Lysin-Lösung (10 µg/ml) und anschließend mit Collagen (2 mg/ml, Roche Diagnostics) beschichtet.

Für Kontrollversuche (nur fluoreszierendes Substrat, kein Inhibitor) wurden die Kapillaren, bedeckt mit Aluminiumfolie, 20 min mit einer Lösung der fluoreszierenden Komponente (vgl. 2.1.2) in Transportpuffer inkubiert. Bei den übrigen Versuchen wurden die Kapillaren zunächst für 20–25 min mit den potentiellen Inhibitoren vorinkubiert und anschließend das fluoreszierenden Substrat zugesetzt. Je nach verwendeter Inkubationskammer bedeutete dies in praxi: 50 µl der Kapillarsuspension wurde nach Zugabe von 200 µl bzw. 450 µl Inhibitor-Transportpuffer-Lösung für 20 min. inkubiert, anschließend wird das gleiche Volumen (250 µl bzw. 500 µl) der doppelt konzentrierten fluoreszierenden Substratlösung zugesetzt. Nach weiteren 20 min. kann die Sekretion unter dem konfokalen Lasermikroskop betrachtet werden. Die resultierenden Endkonzentrationen sind bei den entsprechenden Versuchsergebnissen vermerkt.

Folgende, bei –20 °C aufbewahrte, Stammlösungen wurden verwendet: NaCN 30 mM in Wasser, LTC₄ 49 µg/ml in einer wässrigen Methanol Lösung, alle anderen gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO): Verapamil 10 mM, Bodipy[®]-FL-Verapamil 2 mM, PSC 833 1 mM, Loperamid 1 mM, SDZ 212 611 1 mM, Cyclosporin A 2 mM, Ivermectin 1 mM und 10 mM, Bodipy[®]-FL-Ivermectin 1 mM, Octreotid 1 mM, 2 mM und 10 mM, NBD-Octreotid 2 mM, Fluoreszein-Methotrexat 1 mM. Die Stammlösungen wurden so gewählt, daß bei der Inkubationen der Kapillaren DMSO in einer maximalen Konzentration von 1 % verwendet wurde.

Nach erfolgter Inkubation konnten die Kapillaren aufgrund des Deckglases an der Unterseite der Kammern durch ein invers, konfokales Laser Mikroskope betrachtet werden, und entsprechende Bilder von ihnen aufgenommen werden.

2.2.6.2 Auswertung

Für die Auswertung verwendet wurden ausschließlich solche Kapillarsegmente, die – unter dem konfokalen Mikroskop betrachtet – unversehrt waren. Da nicht davon ausgegangen werden konnte, daß die Kapillaren an ihrem Ende immer kollabierten, ein seitliches Hereindiffundieren des fluoreszierenden Substrates dadurch sicher verhindert wurde, wurden lediglich mittlere Kapillarsegmente ausgewertet; fluoreszierende Bereiche an den Endstücken der Kapillaren wurden nicht in die Auswertung miteinbezogen. Dadurch wurde sichergestellt, daß die gemessene Fluoreszenz-Intensität im Lumen der Kapillaren allein auf Grund von Sekretion durch die Transportproteine bedingt war.

Die mit der zum Mikroskop gehörigen Software (vgl. 2.2.6) aufgenommenen Bilder der Kapillaren wurden mit Scion Image Beta 3 ausgewertet: von (in der Regel 10) Kapillaren wurde die durchschnittliche Fluoreszenz-Intensität sowohl im Lumen als auch in den Zellen ermittelt. Diese wurden jeweils zueinander ins Verhältnis gesetzt, so daß man ein bestimmtes Lumen/Zell-Verhältnis bezüglich der Fluoreszenz-Intensität erhält: Wurde die fluoreszierende Substanz durch Pgp oder Mrp2 ins Lumen der Kapillare transportiert (sekretiert), war also die Konzentration im Lumen größer als in den Zellen, ergab sich ein Fluoreszenz-Intensitäts-Verhältnis größer als 1. War hingegen die Sekretion z.B. durch Zugabe eines Inhibitors gehemmt ergaben sich Werte kleiner als 1.

2.2.7 Konfokale Laser *scanning* Mikroskopie (CLSM)

Für die immunhistochemischen Färbungen wurde ein DM IRBE Mikroskop der Firma Leica (Bensheim, Deutschland) verwendet. Ausgestattet war das inverse Mikroskop unter anderem mit einem 63x Wasser Objektiv und einem luftgekühlten Argon/Krypton sowie einem Helium/Neon Laser. Als Software stand TCS NT zur Verfügung. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mittels einer zwei Kanal Laser-*scanning* Mikroskopie. Es wurde die Methode „FITC/TRITC“ verwendet, da die sekundären Antikörper FITC markiert waren und zum Anfärben der Zellkerne Propidiumjodid verwendet wurde (Anregungs- und Detektionsbereich deckt sich mit TRITC). Das bedeutet, daß mit der 488 nm Laserlinie des Argon/Krypton Lasers angeregt und mittels einstellbarer Filter zwischen 500 nm und 560 nm detektiert wurde (FITC). Das Propidiumjodid wurde mit der 568 nm Laserlinie des Helium/Neon Lasers angeregt und oberhalb 590 nm detektiert.

Die Sekretionsuntersuchungen wurden, mit Ausnahme der Versuche mit Octreotid und fluoreszenzmarkiertem Octreotid (NBD-Octreotid) unter dem selben, inversen Mikroskop wie die Immunfärbungen durchgeführt. Es wurde ebenfalls das 63x Wasser Objektiv und der Argon/Krypton Laser verwendet. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit der Methode „FITC“ (Bodipy-Verapamil, Fluoreszein-Methotrexat und Bodipy-Ivermectin).

Für die Versuche mit Octreotid und NBD-Octreotid wurde ein inverses Mikroskop der Firma Leica (DM IR BE), ausgestattet unter anderem mit einem 63x Wasser Objektiv (HCX PL Apo 63 x/1.20 W corr) sowie einem Argon/Krypton und einem Helium/Neon Laser, verwendet. Als Software für die Steuerung des Mikroskopes war TCS-ST (Leica Mikrosysteme) vorhanden. Die Bilder wurden mit der Methode „FITC“ aufgenommen, was bei diesem System wiederum bedeutet, daß mit der 488 nm Laserlinie des Argon/Krypton Lasers angeregt und mit Hilfe von einstellbaren Prismen in einem Bereich von 500 nm bis 535 nm detektiert wurde.

Um ein Ausbleichen (Photobleachen) der fluoreszierenden Komponenten zu vermeiden, wurde mit einer geringen Laserintensität gearbeitet ($\leq 20\%$ der maximalen Intensität). Eigenfluoreszenz des Gewebes war unter den jeweils gewählten Bedingungen nicht detektierbar.

Die Versuche wurden in der Regel mindestens dreimal durchgeführt. Damit die jeweils erzielten Versuchsergebnisse untereinander vergleichbar waren, wurden die Einstellungen von *pinhole*, *photomultiplier*, *accumulation*, *offset* und Laserintensität bei den einzelnen Versuchsreihen konstant gehalten.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Isolierung der Kapillaren

Der erste Teil dieser Arbeit bestand darin, morphologisch und funktionell intakte Kapillaren aus dem Gehirn von Schweinen zu isolieren, um so ein weiteres *in vitro*-Modell der Blut-Hirn Schranke (BHS) zu erhalten, mit dem man insbesondere den Einfluß der ABC-Proteine P-Glykoprotein und MRP auf den Transport von Arzneistoffen an der BHS untersuchen kann. Im Gegensatz zu Zellkultur-Modellen sollten die Kapillaren nicht nach einem längeren Zeitraum der Kultivierung, sondern direkt nach der Isolierung in ihrem Verhalten frisch untersucht werden, um dadurch den *in vivo*-Bedingungen möglichst nahe zu kommen.

3.1.1 Überblick zur Entwicklung der Isolierungstechniken

Erste Versuche zur Isolierung von Kapillaren aus Gehirnmaterial wurden bereits Ende der Sechziger und Anfang der Siebziger Jahre publiziert. Siakotos beschrieb 1968 eine Methode, die u.a. Orlowski und Sessa 1974 weiterentwickelten. Hierbei wurde das Gehirn von Rindern zunächst in einem Glashomogenisator mechanisch zerkleinert und anschließend in verschiedenen Dichtegradienten zentrifugiert. Entscheidender Nachteil von Siakotos` Ansatz war, daß enorme Mengen an Ausgangsmaterial (mehr als 1 kg menschliches Hirn oder Rinderhirn) nötig waren.

Für die Isolierung von Kapillaren aus Rattenhirn findet sich bei Joó und Karnushina 1973 ein ähnliches Verfahren, welches 1976 von Mrsulja et al. und Krizbai et al. 1995 in leicht veränderter Form wieder aufgegriffen wurde. Das Gehirn von 10 Ratten wurde hier ebenfalls mechanisch zerkleinert und zum Abtrennen von Geweberesten durch Nylonsiebe verschiedener Größe filtriert. Das resultierende Homogenat wurde mittels einer Succrose-Dichte-zentrifugation aufgereinigt. Brendel et al. (1974) isolierten Kapillaren aus der grauen Substanz von Rinderhirnen, indem sie nach Zerkleinern des Gehirngewebes die Kapillaren durch verschiedene Filtrationsschritte aus dem Homogenat herauswuschen.

Goldstein beschrieb 1975 erstmals eine Methode für die Isolierung von Rattenkapillaren, bei der nach Homogenisation und verschiedenen Filtrationsschritten die Kapillaren zum Aufreinigen über eine mit Glasperlen gefüllte Säule gegeben wurden. Toews et al. und Kolber et al. berichteten 1978 bzw. 1979 von einer weiteren Methode zur Kapillarisolierung aus der Ratte, die letztlich eine Kombination der bisher publizierten Verfahren darstellte: Nach mechanischer Zerkleinerung in einem Glashomogenisator, wurde das Gewebe zuerst durch ein Nylonsieb der Maschenweite 350 µm gegeben und anschließend das Filtrat erneut über ein 44 µm Sieb filtriert. Die von dem letzten Sieb zurückgehaltene Kapillarfraktion wurde schließlich zur Aufreinigung einer Succrose-Dichtezentrifugation unterworfen. Diese

Methode wurde in ähnlicher Form auch von Weber et al. 1987 für die Isolierung von Kapillaren aus Schweinehirn angewandt. 1981 verwendeten Bowman et al. zur Isolierung von Kapillaren aus der Ratte nach der Homogenisierung eine Dextran-Dichtezentrifugation, um die Gewebereste von den Zellkernen und Kapillaren abzutrennen. Letztere wurden nach Resuspension über eine Glassäule aufgereinigt. Auch Estrada et al. (1988) verwendeten für die Dichtezentrifugation eine 15 %ige Dextran Lösung, anschließend wurde allerdings zur Aufreinigung lediglich über verschiedene Nylonsiebe filtriert.

Von Pardridge et al. wurde 1985 eine Methode beschrieben, die im Anschluß in leicht veränderter Form auch von Dallaire et al. 1991 und Jetté et al. 1993 zur Isolierung von Kapillaren aus Rinderhirn angewandt wurde. Dabei handelt es sich ebenfalls um eine rein mechanische Methode, bei der nach Entfernen der Hirnhäute die graue Substanz in einem Teflon-Homogenisator zerkleinert wurde. Nach anschließender Zentrifugation in einer 13 %igen Dextranlösung wurde das entstandene Pellet resuspendiert und über ein 210 µm Nylon Sieb gegeben, um größere Blutgefäße abzutrennen. Zum Schluß erfolgte wiederum eine Aufreinigung über eine mit Glasperlen gefüllte Säule.

Neben den rein mechanischen Isolierungsmethoden finden sich in der Literatur auch einige enzymatische Verfahren. So publizierten z.B. Williams et al. 1980 eine Methode zur Isolierung von Kapillaren aus Rattenhirn, bei der das Gehirngewebe nach Zerkleinerung zweimal mit einer Collagenase II/BSA Lösung inkubiert wurde. Das gewaschene Homogenat wurde anschließend wieder über eine Glassäule aufgereinigt. 1991 berichteten Hoyer et al. von einer weiteren Möglichkeit, Kapillaren – diesmal aus Schweinehirn – enzymatisch zu isolieren. Er verwendete nach Zerkleinerung der grauen Substanz eine neutralen Dispase Lösung zur Inkubation und erhielt durch anschließende Dichtezentrifugation ein Pellet aus Kapillaren. Stins et al. verwendeten 1994 schließlich eine Mischung aus Collagenase und Dispase zum Verdauen des Gewebes.

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß sich in der Literatur eine Vielzahl zum Teil sehr unterschiedlicher Methoden zur Isolierung von Kapillaren findet.

Da es Ziel dieser Arbeit war, ein *in vitro*-Modell aus isolierten Gehirn-Kapillaren zu etablieren, mit dem man insbesondere den Einfluß von ABC-Proteinen auf den Transport von Arzneistoffen an der Blut-Hirn Schranke untersuchen kann, wurden unter diesem speziellen Gesichtspunkt verschiedene in der Literatur bereits beschriebene Isolierungstechniken getestet.

3.1.2 Getestete Kapillar-Isolierungstechniken

Ausgangsmaterial für nachstehend beschriebene Versuchsgänge war durchweg Schweinehirn. Hierfür sprachen im wesentlichen folgende Argumente:

- Jegliches Risiko einer möglichen BSE-Infektion wird vermieden,

- Schweinehirn war beim örtlichen Schlachthof leichter verfügbar als Rinderhirn,
- die genetische Ausstattung des Schweins ist derjenigen des Menschen vermutlich ähnlicher, als diejenige von Rindern.

Am nächstliegenden war die von Hoyer 1991 beschriebene Methode, da sie sich mit den ersten Schritten einer in unserem Arbeitskreis zur Isolierung von Gehirn-Endothelzellen angewandten Methode deckte (Dissertation Thöle, 2000). Die graue Substanz wurde in ca. 1 mm² große Stücke zerteilt und anschließend in einer 0,5 %igen Dispase II-Lösung (Roche, Mannheim) bei pH 7,4 und 37 °C für 2 h inkubiert. Die so vom umgebenden Hirngewebe (Neuronen und Gliazellen) gelösten Kapillarfragmente wurden durch Zentrifugation in einer 13 %igen Dextranlösung von diesem getrennt. Das entstandene Pellet enthielt zwar neben zahlreichen Gewebe- und Zelltrümmern auch Kapillaren und größere Blutgefäße. Als Nachteil dieser Methode erwies sich jedoch, daß die Kapillaren sehr stark zusammenklumpten. Zudem war nach ca. 2 h unter dem Mikroskop deutlich zu erkennen, daß sich der intakte Gewebeverband der einzelnen Kapillaren aufgelöst hatte, die Zellen also abgestorben waren.

Bei der Isolierung von Gehirn-Endothelzellen (Dissertation Thöle, 2000) wird eine Inkubation mit Collagenase/Dispase zur Entfernung anhaftender Perizyten und Astrozytenmembranen durchgeführt, eine ähnliche Methode wurde für die Isolierung von Kapillaren bei Stins et al. 1994 beschrieben. Um die vorstehend beschriebenen Nachteile zu vermeiden, wurde in einem nächsten Schritt die graue Substanz in einem Glashomogenisator vorsichtig zerkleinert und direkt im Anschluß in einer 13 %igen Dextran-Lösung zentrifugiert. Das Pellet wurde in einer Collagenase/Dispase Lösung (0,5 mg/ml, Roche, Mannheim) mit Zusatz von 1 % BSA resuspendiert und 1 h bei 37 °C inkubiert. Zelltrümmer wurden anschließend über einer Säule gefüllt mit Glasperlen abgetrennt. Aus diesem Ansatz resultierte ein deutlich geringerer Anteil an Zelltrümmern. Zudem klebten die Kapillaren aufgrund des BSA nicht mehr so stark zusammen, sie sahen jedoch zum Teil wie aufgebläht aus.

Dies konnte zwei Ursachen haben. Entweder war die verwendete Enzymkonzentration zu gering, es hafteten also noch andere Zellreste auf den Kapillaren, oder aber die Membran der Endothelzellen wurde durch die Collagenase angelöst, so daß die Zellen letztlich aufquollen. Die erste Ursache konnte durch die Verwendung einer höheren Enzymkonzentration ausgeschlossen werden, denn die Kapillaren erschienen hiernach tendenziell noch aufgeblähter.

Als Konsequenz wurde der Versuch einer enzymatischen Isolierung fallengelassen, zumal sich in der Literatur Hinweise darauf fanden, daß bei Verwendung von Collagenase die Aktivität des Markerenzym γ -Glutamyl-Transpeptidase (vgl. 3.2.6) stark abnimmt (Risau et al., 1992). Anstelle dessen wurde nun eine rein mechanische Isolierungsmethode ausgetestet. Diese, letztlich auf einer Vorschrift von Pardridge (1985) beruhende Methode, führte

schließlich zum Ziel, morphologisch und funktionell intakte Kapillaren zu isolieren. Sie ist unter 2.2.1 bzw. 3.1.3 im einzelnen beschrieben.

3.1.3 Isolierung der Kapillaren nach einer Methode von Pardridge

Für die optimale Erhaltung der metabolischen Aktivität und um Anoxia-Effekte zu vermeiden, wurden die Gehirne direkt nach dem Schlachtvorgang im Schlachthof entgegengenommen und in eiskaltem, physiologischen Puffer unmittelbar ins Labor transportiert und verarbeitet.

Die Hirnhäute wurden sorgfältig entfernt, um eine Verunreinigung der Kapillarpräparation durch größere Blutgefäße, die die Hirnhaut durchziehen, zu vermeiden. Soweit möglich wurde nur die graue Substanz verwendet, da das in der weißen Substanz enthaltene Myelin die Isolierung erschwert. Die abgeschabte graue Substanz wurde in einem Gewebehomogenisator durch drehende Auf- und Abbewegungen vorsichtig homogenisiert. Dabei werden die Kapillaren von dem übrigen Gehirngewebe der grauen Substanz gelöst und durch die anschließende Dextranzentrifugation von diesem abgetrennt. Die Dichte der Dextranlösung lag zwischen derjenigen des Hirngewebes und der der Kapillaren, so daß nach der Zentrifugation das lipidreiche Hirngewebe oben auf schwamm (flotierte) und die Kapillaren im Pellet verblieben. Um ein Verkleben der Kapillaren zu verhindern, wurde der Pufferlösung bei den nachfolgenden Schritten BSA zugesetzt. Das Natriumpyruvat und die Glukose dienten als Energielieferant.

Zur Abtrennung größerer Blutgefäße und Gewebefragmente wurde das resuspendierte Pellet durch ein Nylonsieb filtriert. Die Maschenweite wurde dabei so gewählt, daß die Kapillaren das Sieb passieren, größere Gefäße jedoch zurückgehalten wurden. Das überwiegend aus Kapillaren und Erythrozyten bestehende Filtrat wurde zur Aufreinigung über eine mit Glasperlen gefüllte Säule gegeben. Bei diesem Schritt verfangen sich die Kapillaren zwischen den Glasperlen, während kleinere Gewebereste und einzelne Zellen, z.B. die Erythrozyten, herausgewaschen wurden. Durch vorsichtiges Rühren in Puffer konnten die Kapillaren anschließend wieder von den Glasperlen gelöst und nach Absetzen der Glasperlen abdekantiert werden.

Als letzter Schritt der Aufbereitungsmaßnahmen wurde das BSA wieder herausgewaschen, da sich sonst die Kapillaren bei den Versuchen am konfokalen Laser Mikroskop nicht am Boden der Inkubationskammern abgesetzt hätten.

3.2 Charakterisierung der isolierten Kapillaren

Die mit vorstehend beschriebener Methode frisch isolierten Kapillaren wurden im nächsten Schritt morphologisch, enzymatisch und immunhistochemisch untersucht.

3.2.1 Morphologisches Erscheinungsbild

Das morphologische Erscheinungsbild der suspendierten Kapillarsegmente ist durch folgende Merkmale charakterisiert:

- überwiegend lagen die Segmente als Einzelstücke vor und klebten nicht als Haufen zusammen;
- sie hatten im Schnitt einen Durchmesser von 8 – 11 μm und waren gelegentlich bis zu mehreren hundert μm lang;
- die Kapillaren waren meistens unverzweigt, zum Teil konnte man auch Vergabelungen erkennen.

Insgesamt war unter dem Mikroskop ein intakter Gewebeverband der Endothelzellen, die durch ihre röhrenförmige Anordnung die Gehirn-Kapillaren bilden, zu sehen. Dieser war auch mehrere Stunden nach der Isolierung noch deutlich und als intakt zu erkennen.

3.2.2 Inkubation mit FITC-Dextran 4000

Da die *tight junctions* einen maßgeblichen Beitrag zur Schrankenfunktion der Blut-Hirn Schranke leisten, wurde mit Hilfe eines Markers für parazelluläre Permeation/Transport überprüft, ob die Integrität und Dichte der *tight junctions* während der einzelnen Isolierungsschritte erhalten blieb. Hierzu wurden die frisch isolierten Kapillaren über einen Zeitraum von 60-80 min mit einer Lösung von FITC-Dextran 4000 (100 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Bei der anschließenden Betrachtung unter dem konfokalen Mikroskop konnte im Lumen der Kapillaren kaum Fluoreszenz detektiert werden. Die Funktionsfähigkeit und Dichte der *tight junctions* als eines der wichtigsten Merkmale der Blut-Hirn Schranke ist also durch die hier angewandte Isolierungsmethode gewährleistet.

3.2.3 GFAP-Färbung

Das *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) ist ein Protein, das fast ausschließlich in Astrozyten vorkommt und daher für den immunhistochemischen Nachweis dieser Zellen verwendet wird.

Die Astrozyten sind Bestandteil der Glia des zentralen Nervensystems und haben ein auffallend sternförmiges Cytoplasma mit vielen feinen Fortsätzen. Über die sogenannten Endfüßchen dieser Fortsätze stehen sie mit den Kapillaren in Kontakt, sind aber noch durch die Basalmembran getrennt. In diesen Fortsätzen enthalten ist eine spezifische Form intermediärer Filamente des Zytoskelettes, die sauren Gliafaserproteine (GFAP). Durch Anfärben dieser Proteine mit einem spezifischen Antikörper (anti-GFAP) können daher die auf den Kapillaren haftenden Astrozyten-Endfüßchen, die sonst selbst im Elektronenmikroskop nicht zu erkennen sind, sichtbar gemacht werden. Die Astrozyten selbst üben keine Barrierefunktion aus, es wird aber vermutet, daß Signale ausgehend vom Gehirn,

insbesondere von den Astrozyten, wichtig für die Integrität der BHS sind. Die Astrozyten induzieren dabei wahrscheinlich Strukturveränderungen des Endothels der Hirngefäße, so daß letzteres typische Charakteristika der Blut-Hirn Schranke zeigt. Unter anderem sollen sie z.B. die Aktivität der γ -Glutamyl-Transpeptidase (γ -GT, vgl. 3.2.6) und die Dichtigkeit der *tight junctions* regulieren (Joó, 1992).

In der Literatur werden unterschiedliche Auffassungen vertreten, ob ein Nachweis noch vorhandener Astrozyten-Endfüßchen auf isolierten Gehirn-Kapillaren als positiv oder negativ zu bewerten ist. Werden die Kapillaren mit einem rein mechanischen Verfahren isoliert, bleiben die Endfüßchen zwangsläufig auf den Kapillaren haften, während der restliche Zellleib der Astrozyten mechanisch abgerissen wird. White et al. (1981) interpretierten dies positiv, da diese Isolierungstechnik gewährleistet, daß die meisten der interzellulären Kontakte und dadurch die Integrität dieses heterogenen Netzwerkes von Zellen, die letzten Endes die Blut-Hirn Schranke bilden, erhalten bleiben. In Analogie dazu gelang es auch Golden und Pardridge (1999), auf den mechanisch isolierten Gehirn-Kapillaren durch eine positive Färbung des GFAP Astrozyten-Endfüßchen nachzuweisen.

Werden die Kapillaren hingegen mittels eines enzymatischen Verfahrens isoliert, wird dabei durch die Enzyminkubation die Kapillar-Basalmembran proteolysiert. Dies bedeutet, die Kapillar-Endothelzellen werden von anhängenden Gliazellen, insbesondere den Astrozyten-Endfüßchen, getrennt. Seetharaman et al. (1998) interpretierten daher eine sehr schwache bis gänzlich fehlende Anfärbung des GFAP als Nachweis für die Reinheit der isolierten Kapillaren.

Ob ein Verbleiben von Astrozyten-Endfüßchen auf den Kapillaren eine Verunreinigung der Kapillarpräparation darstellt, oder aber vielmehr wichtigen Beitrag zum Nachweis der Integrität der isolierten Kapillaren liefert, bleibt zu diskutieren. Da bei den Versuchen, die Kapillaren enzymatisch aus dem Gehirngewebe freizulegen und zu isolieren, im Mikroskop deutlich aufgeblähte und angeschwollene Endothelzellen zu erkennen waren, deren röhrenförmige Anordnung zudem nach kurzer Zeit in die einzelnen Zellen zerfiel, schließe ich mich der Bewertung von White et al. an und gebe einer mechanischen Isolierungsmethode eindeutig den Vorzug (vgl. 3.1.2).

Nachdem die Kapillaren im Rahmen dieser Arbeit in Anlehnung an die Methode von Pardridge isoliert wurden, war gleichermaßen ein positiver Nachweis der Astrozyten zu erwarten. Das für Astrozyten spezifischen GFAP wurde durch eine indirekte, immunhistochemische Anfärbung (anti-GFAP und FITC gekoppelter, sekundärer Antikörper) nachgewiesen. Die Zellkerne wurden zur besseren Orientierung mit Propidiumjodid rot angefärbt. Unspezifische Bindungsstellen wurden zuvor durch BSA geblockt. Als Negativkontrolle wurde zudem ein Teil der Kapillaren ausschließlich mit sekundärem Antikörper und Propidiumjodid angefärbt.

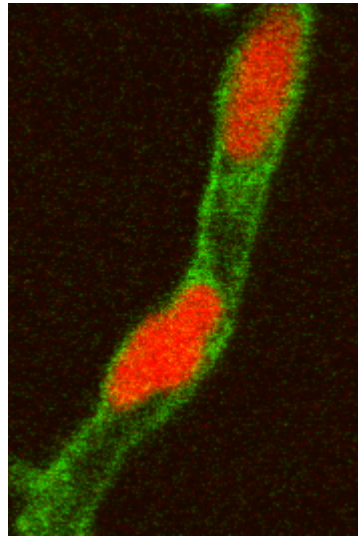


Abbildung 6: Immunhistochemische Färbung des glial fibrillary acidic protein (GFAP, grün), Zellkerne der Kapillar-Endothelzellen sind mit Propidiumjodid rot gefärbt

In vorstehender Abbildung zeigt die grüne Fluoreszenz auf der abluminalen Seite der Kapillaren – hervorgerufen durch den FITC markierten, sekundären Antikörper – deutlich die Lokalisation der Astrozyten-Endfüßchen.

3.2.4 vWF-Färbung

Der von Willebrand Faktor (vWF) ist ein Glykoprotein, das an der Blutgerinnungskaskade als Teil des Faktor VIII-Komplexes beteiligt ist. Durch Aggregation von Thrombozyten am verletzten Gefäß-Endothel bewirkt es eine Stillung der Blutung. Der vWF ist im wesentlichen in den Endothelzellen lokalisiert und gilt daher als spezifischer Endothelzellmarker (Jaffe et al., 1973 und 1974; Beuckmann et al., 1995; Bowman et al., 1981, Mischeck et al., 1989).

Der Nachweis des vWF wurde durch eine indirekte, immunhistochemische Färbung geführt, bei der sich zunächst ein spezifischer, nicht fluoreszierender primärer Antikörper an das Protein bindet, welches im Anschluß mittels eines FITC-gelabelten Zweitantikörpers nachgewiesen werden kann. Zuvor wurden die Kapillaren mit einer Lösung aus Glutaraldehyd und Paraformaldehyd fixiert, damit die räumliche Struktur der Kapillaren weitestgehend erhalten blieb.

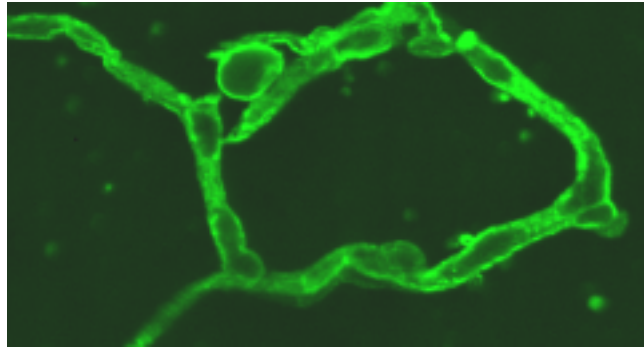


Abbildung 7: Immunhistochemische Färbung des spezifischen Endothelzell-Markers von Willebrand Faktors (vWF, grün)

Die isolierten Kapillaren zeigen – wie vorstehende Abbildung exemplarisch verdeutlicht – eine grüne FITC-Färbung. Die Expressierung des spezifischen Markerproteins von Willebrand Faktor (vWF) konnte somit eindeutig nachgewiesen und damit die von Pardridge für menschliche Gehirn-Kapillaren beschriebenen Ergebnisse (Pardridge et al., 1985) mit den verwandten Kapillaren aus Schweinehirn ebenfalls nachvollzogen werden.

Für ein anderes Modell der Blut-Hirn Schranke, den isolierten und anschließend wieder zu Monolayern gezüchteten Gehirn-Endothelzellen (BCECs), finden sich in der Literatur bezüglich dieses spezifischen Endothelzell-Markers unterschiedliche Angaben. Einige Gruppen konnten den vWF durch Immunfärbungen in kultivierten Zellen nachweisen (Beuckmann et al., 1995; Thöle, Dissertation, 2000) andere wiederum nicht (Mischek et al., 1989). Im Gegensatz dazu konnte für das hier verwendete Modell der Blut-Hirn Schranke – isolierte Kapillaren – eindeutig das Vorhandensein bzw. die Expressierung dieses für Endothelzellen spezifischen Markerproteins vWF nachgewiesen werden.

3.2.5 Alkalische Phosphatase Anreicherung

Die Alkalische Phosphatase (AP) ist ein Enzym, das überwiegend in der luminalen Membran von Gehirn-Endothelzellen lokalisiert ist (Vorbodt et al., 1983). Endothelzellen, die die Blutkapillaren in anderen Körperteilen auskleiden, weisen keine signifikante Expressierung dieses Enzyms auf, so daß die AP als Markerenzym für differenzierte Gehirn-Endothelzellen etabliert ist (Bradbury, 1985; Joó, 1992; Meyer et al., 1990; Williams, 1980; Mizuguchi, 1994; Beuckmann et al., 1995). Die AP katalysiert unter anderem die Hydrolyse einer Reihe von phosphorylierten Metaboliten, wie z.B. Hexosen oder Mononukleotiden, und kontrolliert so vermutlich deren transendothelialen Transport ins Gehirn. Da zusätzlich verschiedene Enzyme durch Dephosphorylierung aktiviert bzw. deaktiviert werden, leistet die AP wahrscheinlich auf diese Weise einen wichtigen Beitrag zur sogenannten „enzymatischen Blut-Hirn Schranke“ (Meyer et al., 1990; Catalán et al., 1988, Djuricic und Mrsulja, 1977).

Die Aktivitätsbestimmung der AP wurde mit einem Testkit der Firma Sigma durchgeführt. Das Prinzip der Messung beruht darauf, daß das Substrat p-Nitrophenylphosphat in Gegenwart eines Aminoalkoholes (2-Amino-2-methyl-1-propanol, der in der alkalischen Pufferlösung enthalten war) durch die AP zu p-Nitrophenol umgesetzt wird. Die AP fungiert hierbei als Phosphotransferase, wobei die Phosphatgruppe auf den Aminoalkohol als Akzeptor übertragen wird. Durch Zugabe von Natronlauge wird die Reaktion gestoppt und das gebildete p-Nitrophenol liegt nun als gelbes Phenolat vor, das bei 410 nm photometrisch vermessen werden kann. Durch anschließende Zugabe einiger Tropfen konzentrierter Salzsäure erhält man erneut das farblose Nitrophenol, sodaß nach Abzug des gemessenen Wertes genau diejenige Absorption resultiert, die durch p-Nitrophenolat verursacht wurde. Die Versuche waren so angelegt, daß sowohl die Aktivität der isolierten Kapillaren, als auch die des Gehirnhomogenates, jeweils bezogen auf die Proteinmenge, bestimmt wurden.

Mehrere Aktivitätsmessungen in den isolierten Kapillaren – jeweils unmittelbar nach der Kapillarpräparation – ergaben Werte von 61 ± 5 U/mg Protein. Eine Sigma-Einheit U der Enzymaktivität EA entspricht unter den gegebenen Versuchsbedingungen der Umsetzung von 1 μ mol p-Nitrophenol pro Minute bei 37 °C. Für die Aktivität im Gehirnhomogenat fanden sich Werte von $1,9 \pm 0,1$ U/mg Protein, dies bedeutet eine 32 ± 1 fache Anreicherung der AP-Aktivität in den Kapillaren gegenüber dem Ausgangsmaterial Gehirnhomogenat (die Einzelwerte sind in Tabelle 1 im Anhang aufgeführt).

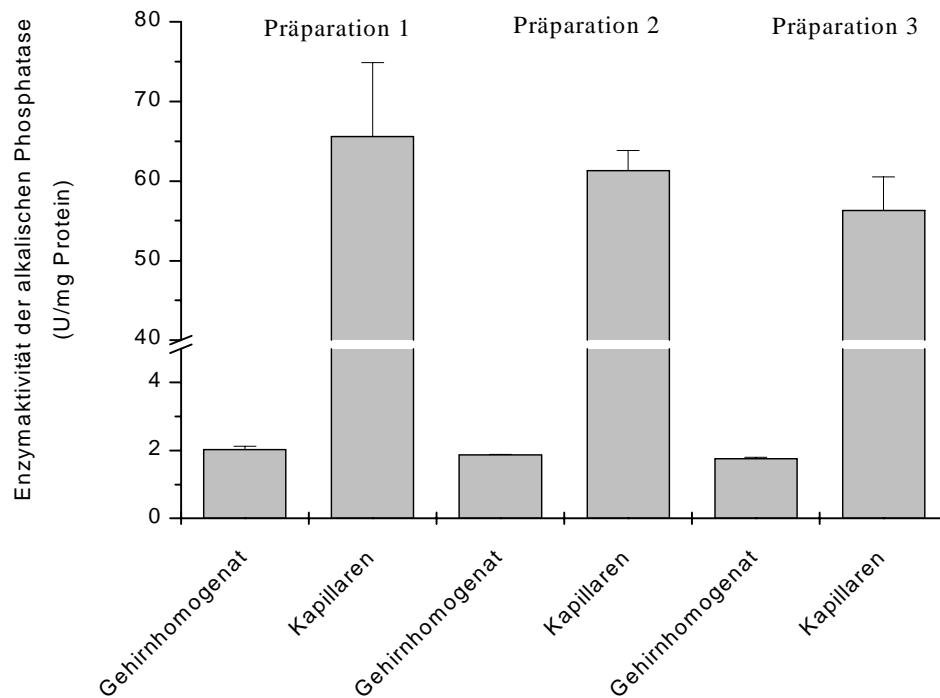


Abbildung 8: Aktivitätsbestimmung der alkalischen Phosphatase im Gehirnhomogenat und den isolierten Kapillaren (in Sigma Units/mg Protein)

In der Literatur finden sich bezüglich der Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase sehr unterschiedliche Angaben. Die Ursache ist insbesondere darin zu sehen, daß es sich hierbei um ein biologisches System handelt, bei dem natürliche Schwankungen auftreten. Zudem beeinflussen die Art der verwendeten Spezies (Rind, Ratte, Schwein, Ziege), die angewandte Isolierungsmethode sowie unterschiedliche Versuchsbedingungen die Ergebnisse. Beispielsweise fand Estrada eine 22 fache Anreicherung der AP Aktivität in isolierten Kapillaren der Ziege (Estrada et al., 1988). Goldstein beschrieb eine 15 fache Anreicherung in Kapillaren isoliert aus der Ratte (Goldstein, 1975) und Dallaire fand eine 8-12 fache Anreicherung beim Rind (Dallaire, 1991).

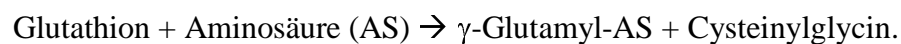
Untersuchungen der Aktivität der AP in isolierten Gehirn-Endothelzellen vom Schwein finden sich bei Meyer und Beuckmann. Beide verwendeten ebenfalls den Sigma Kit zur Messung der AP-Aktivität, die Versuchsbedingungen waren also vergleichbar (Meyer et al., 1990; Beuckmann et al., 1995). In beiden Fällen wurde die Aktivität in isolierten und anschließend wieder kultivierten Gehirn-Endothelzellen bestimmt. Zu Beginn der Kultivierung, am Tag 0, finden sich bei Beuckmann und Meyer, die denen in frisch isolierten Kapillaren vergleichbar sind. Ein Nachteil der kultivierten Endothelzellen jedoch ist, daß die Aktivität dieses für Gehirn-Endothelzellen charakteristischen Enzyms im Verlauf der Kultivierung sehr stark abnimmt; ein Phänomen, das auch von anderen Arbeitsgruppen

beschrieben wird (Meyer et al., 1990; Seetharaman et al., 1998; Beuckmann et al., 1995). Dieses Problem wird bei dem Modell der frisch isolierten Kapillaren vermieden.

Es bleibt festzuhalten, daß die Anreicherung der AP-Aktivität in den Kapillaren gegenüber dem Gehirnhomogenat konstant und reproduzierbar ist. Die Qualität der isolierten Kapillaren ist somit von Präparation zu Präparation keinen großen Schwankungen unterworfen.

3.2.6 γ -Glutamyl-Transpeptidase Anreicherung

Die γ -Glutamyl-Transpeptidase (γ -GT, EC 2.3.2.2.) gilt als wichtiges Markerenzym für Gehirn-Endothelzellen (Caspers und Diglio, 1984, Goldstein, 1975; Lechardeur und Scherman, 1995). Sie ist ein membrangebundenes Glykoprotein, daß wie die AP mit einer hohen Aktivität besonders in der Membran von Gehirn-Endothelzellen lokalisiert ist (Albert et al., 1966) und dort ebenfalls beim Transport polarer Moleküle über die Blut-Hirn Schranke eine Rolle spielt (Orlowski et al., 1974). Die γ -GT findet sich vor allem in solchen Geweben, in denen Transportprozesse eine wichtige Rolle spielen. Neben der Blut-Hirn Schranke sind dies beispielsweise das Gallengewebe (Oude Elferink et al., 1994) oder die proximalen Tubuli in der Niere (Hughey et al., 1978). Die γ -GT scheint insbesondere mittels nachfolgender Reaktion am Aminosäure-Transport-System und der Regulation des Glutathion Spiegels in den Zellen beteiligt zu sein (Orlowski et al., 1970 und 1974; Caspers und Diglio, 1984):



Die γ -GT überträgt einen γ -Glutamylrest von einem Donorpeptid (meist Glutathion) auf Aminosäuren oder Dipeptide als Akzeptor. Das entstandene γ -Glutamylderivat wird anschließend in die Zelle transportiert. Dort wird durch ein weiteres Enzym des γ -Glutamyl Zyklusses, der γ -Glutamyl-Transferase, die Aminosäure wieder freigesetzt.

Zudem wird in der Literatur eine Beteiligung der γ -GT an der Phase II-Detoxifizierung diskutiert, da Metabolite in der Phase II unter anderem mit Glutathion konjugiert werden, und diese Konjugate dann mittels der γ -GT aus der Zelle heraustransportiert werden können.

Die Bestimmung der Aktivität der als Markerenzym für die Blut-Hirn Schranke geltenden γ -Glutamyl-Transpeptidase erfolgte auf der Basis der von Caspers und Diglio (1984) beschriebenen Methode. Als Substrat wurde γ -Glutamyl-p-nitroanilid (Orlowski und Meister, 1963) und als Akzeptor Glycylglycin verwendet. Bei dieser Reaktion wird der Glutamylrest des Substrates durch die γ -GT auf das Glycylglycin übertragen und dabei p-Nitroanilin freigesetzt. Letzteres kann wiederum photometrisch vermessen werden. Die Enzymaktivität EA wird in U/mg Protein angegeben, wobei 1 U für die Freisetzung/Bildung von 1 nmol p-Nitroanilin pro Minute bei 37 °C steht. Da Dallaire davon ausgeht, daß die γ -GT ein membrangebundenes Enzym ist, dessen katalytisches Zentrum dem Cytoplasma der Endothelzellen zugewandt ist, empfiehlt er vor der Aktivitätsbestimmung die Zellmembranen mit

einem Detergenz (in diesem Falle Triton-X 100) zu solubilisieren, um dem Substrat den Zugang zum Enzym zu erleichtern (Dallaire et al., 1991).

Wie bei der Alkalischen Phosphatase (siehe oben 3.2.5), wird die Anreicherung der Enzymaktivität in den frisch isolierten Kapillaren gegenüber dem Gehirnhomogenat zur Beurteilung der Qualität der Kapillarisolierung herangezogen. Messungen nach verschiedenen Kapillarpräparationen ergaben, daß die γ -GT in den frisch isolierten Kapillaren gegenüber dem Gehirnhomogenat 19 ± 4 fach angereichert ist (die Einzelwerte sind im Anhang in der Tabelle 2 aufgeführt). In der Literatur finden sich, vergleichbar zur AP, je nach verwendeter Spezies, Isolierungsmethode oder Versuchsbedingungen, sehr unterschiedliche Werte. So berichten z.B. Dallaire et al. (1991) von einer 14-20 fachen Anreicherung beim Rind, abhängig von der jeweils verwendeten Triton-X 100 Konzentration. Im Vergleich dazu finden Orłowski et al. (1974) hingegen nur eine 8 fache Anreicherung. Goldstein (1975) erhält in der Ratte eine 20 fache Anreicherung der γ -GT gegenüber dem Cortex. Höhere Werte werden z.B. von Estrada et al. (1988) für die Ziege (31 fach) oder von Pardridge et al. (1985) für menschliche Kapillaren (32 fach) gefunden.

Der bereits für das Enzym AP beschriebene Nachteil einer starken Abnahme der Enzymaktivität im Verlauf der Kultivierung bei einigen Zellkultur-Modellen (vgl. oben 3.2.5) trifft auch für die Aktivität der γ -GT zu. Ist die Aktivität nach der Isolierung der Endothelzellen noch recht hoch, so nimmt auch die Aktivität der γ -GT mit zunehmender Kulturdauer rapide ab (Goetz et al.; 1985; De Bault und Cancilla, 1980, Mischeck et al., 1989, Meyer et al., 1990; Lechardeur und Scherman, 1995). Zwar ist die Ursache hiervon noch weitestgehend unbekannt, jedoch äußern einige Autoren die Vermutung, daß Astrozyten eine induktive Wirkung besitzen, demnach also essentiell für die Entwicklung der Blut-Hirn Schranke Charakteristika in kultivierten Endothelzellen wären. Für einen solchen Zusammenhang spricht beispielsweise, daß die Aktivität der γ -GT durch Co-Kultur mit C₆ Gliomzellen, einem aus Astrozyten hervorgegangenen Rattentumor, wieder erhöht werden kann (De Bault und Cancilla, 1980, Risau et al., 1992).

Festzuhalten bleibt, wie schon für die Aktivität der Alkalischen Phosphatase, daß man bei der hier gewählten Isolierungsmethode in den frisch isolierten Kapillaren eine deutliche und gleichbleibende Anreicherung des für die Blut-Hirn Schranke spezifischen Markerenzym γ -GT findet. Eine Abnahme seiner Aktivität durch Kultivierung und ein damit eventuell einhergehender Verlust von wichtigen Eigenschaften der Blut-Hirn Schranke wird in diesem Modell vermieden.

3.3 Exprimierung der ABC-Transporter P-Glykoprotein und Mrp2 in isolierten Kapillaren

Ziel dieser Arbeit war es, ein *in vitro*-Modell der Blut-Hirn Schranke zu erarbeiten, an dem sich insbesondere der Einfluß der ABC-Proteine P-Glykoprotein und Mrp2 auf den Transport von Arzneistoffen an der Blut-Hirn Schranke untersuchen läßt. Nach Isolierung von morphologisch und funktionell intakten Kapillaren aus dem Gehirn von Schweinen, war zunächst die Exprimierung dieser Transportproteine sowie deren funktionelle Aktivität in den hier vorliegenden, isolierten Kapillaren nachzuweisen. Für einen durch P-Glykoprotein (Pgp) vermittelten Transport in intakten isolierten Kapillaren finden sich bislang – soweit ersichtlich – keine direkten Beweise in der Literatur. Den bloßen Umstand, daß Pgp in isolierten Kapillaren exprimiert wird, bestätigen hingegen auch andere Arbeitsgruppen (Jetté et al., 1993; Gottesman und Pastan, 1993; Regina et al., 1998). Zudem war bislang nicht geklärt bzw. wurde in der Literatur kontrovers diskutiert, ob andere Mitglieder der ABC-Transporter Familie ebenfalls an Transportprozessen an der Blut-Hirn Schranke beteiligt sind. Vermutungen, daß Mitglieder der MRP-Familie an diesen Transportprozessen beteiligt sind, ließen sich bisher lediglich aus Versuchen mit Membranvesikeln, die aus einer Gehirn-Endothelzell-Linie (MBEC4, Kusuhara et al., 1998a) präparierten wurden, sowie aus Versuchen mit kultivierten Gehirn-Endothelzellen (Regina et al., 1998; Huai Yun et al., 1998) ableiten.

3.3.1 ABC-Transporter

Zur Familie der ABC-Transporter, der ATP-bindenden Kassetten-Transporter, zählen nach heutigem Stand ca. 8000 eukaryotische und prokaryotische Proteine, von denen wiederum ca. 2000 insbesondere dem Transport von Nährstoffen, Peptiden, Aminosäuren, Polysacchariden und auch Arzneistoffen dienen (Gottesman und Pastan, 1993; Higgins et al., 1992; Barrand et al., 1997). Sie spielen nicht nur bei verschiedenen Krankheiten wie z.B. Malaria, Leishmanose und Krebs eine wichtige Rolle, sondern sind auch an physiologischen Prozessen beteiligt (Cole und Deeley, 1998). Der Sulfonylharnstoff-Rezeptor SUR 1 ist beispielsweise als Untereinheit des ATP-sensitiven K⁺-Kanals in pankreatischen β -Zellen bei der Regelung der Insulinsekretion beteiligt. Eine Mutation dieses Rezeptors kann bei Kindern eine persistente Hyperinsulinämie verursachen (Aguilar-Bryan et al., 1995; Thomas et al., 1995). Eine Mutation des CFTR, ein cAMP regulierter Chlorid-Kanal, ist Ursache der cystischen Fibrose (Riordan et al., 1989; Welsh et al., 1993).

Die für die vorliegende Arbeit interessante Untergruppe der ABC-Transporter Familie ist die der *multidrug resistance*-Proteine, zu denen das P-Glykoprotein (Pgp) und die MRP-Familie (*multidrug resistance related proteins*) zählen. Unter *multidrug resistance* (MDR) versteht man das Phänomen, daß die Behandlung eines Tumors mit einem Chemotherapeutikum über

kurz oder lang sowohl zur Resistenz gegenüber dem eingesetzten als auch zur Kreuzresistenz gegenüber anderen Chemotherapeutika führen kann, denen der Tumor zuvor jedoch nie ausgesetzt war (Loe et al., 1996). Heute ist bekannt, daß diese *multidrug resistance* sowohl durch Überexprimierung des schon länger bekannten P-Glykoproteins, als auch durch die erst in den letzten Jahren entdeckten Mitglieder der MRP-Familie ausgelöst werden kann.

In der Gruppe der Wirbeltiere sind die ABC-Transporter strukturell sehr ähnlich aufgebaut (Cole und Deeley, 1998). Sie besitzen in der Regel mehrere hydrophobe Transmembrandomänen, die zum Teil glykosyliert sein können, und meist zwei hydrophile, cytosolische ATP-bindende Domänen (vgl. 3.3.2.1 bzw. 3.3.3.1)

3.3.2 P-Glykoprotein

3.3.2.1 Allgemeines zu P-Glykoprotein

- Entdeckung

Die Entdeckung des P-Glykoproteins ist auf Juliano und Ling (1976) zurückzuführen. Sie gingen seinerzeit davon aus, daß die beobachtete *multidrug resistance* (MDR) in den untersuchten chinesischen Hamster-Ovar Zellen auf eine veränderte Permeabilität der Plasmamembran und auf eine damit einhergehend verminderte Arzneistoff-Permeation in die Zellen zurückzuführen ist. In der Plasmamembran dieser *multidrug* resistenten Zellen fanden sie ein großes Glykoprotein, das hierfür verantwortlich schien, und sie nannten es „P-Glykoprotein“ (Pgp).

Inzwischen wurde nachgewiesen, daß Pgp nicht auf Grund einer Veränderung der Permeabilität der Zellmembran zu einer *multidrug resistance* (MDR) führen kann, sondern daß es als sogenannte *drug efflux*-Pumpe agiert. P-Glykoprotein transportiert hierbei aktiv eine Reihe cytotoxischer Arzneistoffe aus der Zelle oder der Zellmembran wieder heraus und kann so eine MDR verursachen (Gottesman und Pastan, 1993; Goldstein et al., 1992, Ambudkar et al., 1999).

- Struktur

P-Glykoprotein ist ein ca. 170 kDa großes, N-glykosyliertes, phosphoryliertes Mitglied der ABC-Transporter Familie. Es besteht aus 12 helikalen Transmembrandomänen, sowie zwei cytosolischen ATP-bindenden Domänen.

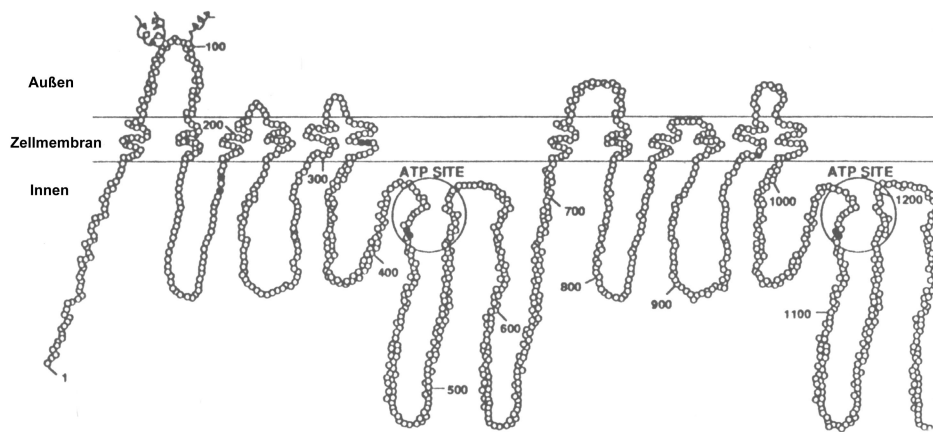


Abbildung 9: Schematische Darstellung des ABC Transporters P-Glykoprotein, entnommen aus Gottesman und Pastan, 1993

Im menschlichen Genom finden sich unter anderem die zwei Gene, MDR1 und MDR2. Jedoch kann lediglich das Genprodukt von MDR1 eine *multidrug* Resistenz bewirken. MDR2 spielt mit hoher Wahrscheinlichkeit als Translokase für Phospholipide (Flipase) in der Plasmamembran eine Rolle (Müller und Jansen, 1997; Higgins und Gottesman, 1992). Die entsprechenden Gene der Maus sind *mdr1a* und *mdr1b* sowie *mdr2*, wobei an der Blut-Hirn Schranke *mdr1a* der dominante Subtyp ist (Jetté et al., 1995a; Schinkel et al., 1994). Beim Schwein finden sich 5 Gene: *mdr1a-d* und *mdr3*, wobei *mdr1a* in den Endothelzellen des Gehirns und *mdr3* in der Leber nachgewiesen wurde (Childs und Ling, 1996).

- Substrate

Das Spektrum an Substraten von P-Glykoprotein ist breit, sie sind in der Regel lipophil und neutral bis kationisch (Seelig, 1998). Neben vielen Krebs-Therapeutika, wie z.B. den Vinca-Alkaloiden, Taxol, Etoposid, einigen Anthracyclinen und Antibiotika, zählen auch Detergentien (Tween 80, Cremophor EL) und andere Arzneistoffe zu den Substraten. Hierzu gehören unter anderem zentral aktive Substanzen wie Domperidon, Phenytoin, Ondansetron, Morphin, aber auch Steroidhormone, Immunsuppressiva, Ca-Kanal-Blocker, Antiarrhythmika, cyclische Peptide, das Antidiarrhoikum Loperamid und viele andere mehr (Kusuhara et al., 1998b; Schinkel et al., 1996).

- Gewebeverteilung und physiologische Funktionen

Neben seiner Rolle als Ursache einer *multidrug resistance* in Krebszellen, übt P-Glykoprotein auch eine Reihe von physiologischen Funktionen aus. Da einige Steroide Substrate des P-Glykoproteins sind (Ueda et al., 1992; Schinkel et al., 1995; Meijer et al., 1998) und Pgp zudem in der Nebenniere exprimiert wird (Thiebaut et al., 1987), wird außerdem über eine mögliche Beteiligung bei der Sekretion von Steroiden diskutiert.

Eine der wichtigsten physiologischen Funktion des P-Glykoprotein dürfte jedoch in dessen protektiver Aufgabe liegen. P-Glykoprotein wird in hohem Maße in solchen Geweben exprimiert, die im Körper eine Schrankenfunktion besitzen. Zum Beispiel ist es als *drug efflux*-Pumpe in der kanalikulären Membran der Hepatozyten bei der Exkretion von Xenobiotika in die Galle involviert (Silverman und Thorgeirsson, 1995; Kusuhara et al., 1998b). Die Exprimierung von P-Glykoprotein im Darmepithel trägt dazu bei, daß manche Arzneistoffe nicht unkontrolliert in den Körper gelangen können (Sparreboom et al., 1997). In den Nieren-Tubuli ist P-Glykoprotein an der aktiven Exkretion von Arzneistoffen in den Urin und damit an deren *Clearance* beteiligt. Da zudem einige der Substrate von Cytochrom P450 mit denen von P-Glykoprotein übereinstimmen und Pgp in Leber, Darm und Niere exprimiert wird, ist Pgp zum Teil an der Detoxifizierung in der Leber und Niere sowie bei der restriktiven Aufnahme von Xenobiotika im Intestinum beteiligt.

Die protektive Rolle von Pgp wird durch seine strategisch günstige Lokalisation in der apikalen Membran der Epithelzellen unterstützt. Bezüglich der genauen Lokalisation gab es allerdings in letzter Zeit einige kontroverse Diskussionen (vgl. 3.3.2.2). Auch in den Testes und der Plazenta ist P-Glykoprotein an der Blut-Gewebe Schranke beteiligt und hilft, diese Organe und den Fötus gegen Arzneistoffe und toxische Metabolite zu schützen (Lankas et al., 1998).

- Funktion an der Blut-Hirn Schranke

Eine besondere Schutzfunktion übernimmt P-Glykoprotein an der Blut-Hirn Schranke. Hier trägt es dazu bei, das besonders empfindliche Gehirngewebe allgemein vor toxischen Substanzen zu schützen. Hierin liegt auch der Grund, warum viele Substanzen/Arzneistoffe, obwohl sie klein und lipophil genug wären, die Blut-Hirn Schranke nicht passieren können. P-Glykoprotein wirkt auch hier als *drug efflux*-Pumpe und verhindert so ein ungewolltes Eindringen von für das Gehirn schädlichen Stoffen. Es ist somit ein wesentlicher Bestandteil der Schrankenfunktion der Blut-Hirn Schranke (van Asperen et al., 1997; Tamai und Tsuji, 1996; Jetté et al., 1993)

Als Nachteil kann sich dies vor allem bei der Behandlung von Krankheiten im ZNS auswirken, beispielsweise bei der Therapie von Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson. Viele Arzneistoffe gelangen gar nicht oder nur in zu geringen Mengen ins Gehirn; für die Therapie nötige Konzentrationen können nicht erreicht werden.

Anhand eines *in vitro*-Modells der Blut-Hirn Schranke kann so im Vorfeld getestet werden, ob bestimmte Arzneistoffe hier als Substrat des P-Glykoproteins in Frage kommen. Die Sekretion durch Pgp zurück ins Blut also eine mögliche Ursache für die geringe Gehirn-Permeation des Arzneistoffes darstellt. Weiterhin kann dann auch getestet werden, ob z.B.

durch Co-Medikation mit bestimmten Hemmstoffen des Transportproteins die Blut-Hirn Schranken-Gängigkeit des Arzneistoffes positiv beeinflußt werden kann.

Durch die Isolierung der Gehirn-Kapillaren unter Erhalt des intakten Gewebeverbandes der Endothelzellen stand ein spezielles *in vitro*-Modell der Blut-Hirn Schranke zur Verfügung, bei dem man davon ausgehen kann, daß es den *in vivo* Bedingungen sehr nahe kommt. Als nächstes galt es den Nachweis zu führen, daß P-Glykoprotein in den Endothelzellen exprimiert wird und als *drug efflux*-Pumpe funktionell aktiv ist. Damit stünde ein *weiteres in vitro*-Modell der Blut-Hirn Schranke zur Verfügung, das sich insbesondere gegenüber den Zellkultur-Modellen oder den Zell-Linien durch einen intakten Gewebeverband der Endothelzellen auszeichnet, und anhand dessen ein möglicher Einfluß von P-Glykoprotein auf den Transport von Arzneistoffen an der Blut-Hirn Schranke untersucht werden kann.

Der für die Funktionsfähigkeit des Modells erforderliche Nachweis einer Expressierung von P-Glykoprotein in den isolierten Kapillaren wurde zum einen durch eine immunhistochemische Färbung, zum anderen durch einen Western Blot erbracht. Die funktionelle Aktivität des Pgp wurde durch Sekretionsversuche an den frisch isolierten Kapillaren nachgewiesen.

3.3.2.2 P-Glykoprotein Färbung

P-Glykoprotein wurde, wie auch schon der von Willebrand Faktor (vWF, vgl. 3.2.4) und das GFAP (vgl. 3.2.3) in den isolierten Kapillaren durch ein indirektes immunhistochemisches Verfahren nachgewiesen. Um die räumliche Struktur der Kapillaren zu erhalten und ein Schrumpfen der Endothelzellen zu verhindern, wurden die Kapillaren zuvor mit einer Lösung aus Paraformaldehyd und Glutardialdehyd fixiert. Für die Anfärbung wurde der Pgp-Antikörper C219 der Firma Alexis (Grünberg) verwendet. Dieser Antikörper „erkennt“ ein internes Epitop des P-Glykoproteins, zeigt aber keine Kreuzreaktivität gegenüber Mitgliedern der MRP-Familie (Scheffer et al., 2000; Zaman et al., 1994). Die Zellkerne wurden mit Propidiumjodid rot angefärbt. Der sekundäre Antikörper war FITC gekoppelt, so daß man Pgp fluoreszenzmikroskopisch unter dem konfokalen Laser Mikroskop nachweisen konnte. Auch bei diesem Nachweis wurden unspezifische Bindungsstellen mit BSA geblockt und ein Teil der Kapillaren zudem als Negativkontrolle nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert.

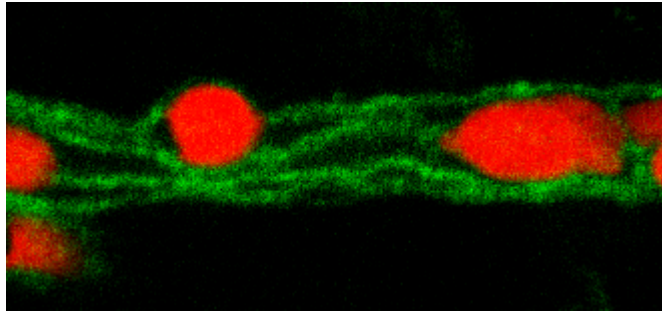


Abbildung 10: Immunhistochemische Färbung der isolierten Kapillaren mit dem Antikörper C219 gegen P-Glykoprotein. Die Zellkerne der Kapillar-Endothelzellen sind mit Propidiumjodid rot gefärbt

Die Bilder vom konfokalen Lasermikroskop zeigen zum einen den deutlichen Nachweis des P-Glykoproteins in den isolierten Kapillaren. Zum anderen läßt die Immunfärbung auf eine luminal Lokalisation dieses Transportproteins schließen.

Allerdings gibt es in der Literatur hinsichtlich der Lokalisation von P-Glykoprotein in den isolierten Kapillaren kontroverse Diskussionen. Experimente der Arbeitsgruppe um Pardridge ergaben bei der Anfärbung mechanisch isolierter, menschlicher Kapillaren eine Co-Lokalisation von P-Glykoprotein (angefärbt mit dem Pgp-Antikörper MRK16) und Astrozyten (nachgewiesen durch eine GFAP-Färbung, vgl. 3.2.3). Er schloß daraus, daß das Pgp auf den Astrozyten-Endfüßchen, also der abluminalen Seite des Gehirn-Kapillarsystems, lokalisiert sei (Pardridge et al., 1997; Golden und Pardridge, 1999). Dem gegenüber stehen Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen, die deutlich eine Pgp Färbung in den isolierten Endothelzellen bzw. Kapillaren zeigten (Jetté et al., 1993; Seetharaman et al., 1998; Gaillard et al., 2000). Hier hält Pardridge entgegen, daß Seetharaman die Kapillaren enzymatisch isolierte. Dies wiederum bedeutet, daß durch Proteolyse der Basalmembran die Kapillar-Endothelzellen von den Astrozyten-Endfüßchen getrennt wurden, er also gar keine Co-Lokalisation hätte sehen können.

Die vorliegenden Ergebnisse der Immunfärbung decken sich mit denen von Seetharaman, Jetté und Gaillard: es ist deutlich eine Färbung des P-Glykoproteins an der luminalen Membran der Endothelzellen zu erkennen. Zusätzlich kann man aber auf der basolateralen Oberfläche der Kapillaren ebenfalls eine Anfärbung von Pgp erkennen/vermuten. Allerdings bleibt offen, ob Pgp in der Basalmembran der Endothelzellen oder aber auf Überresten anhängender Astrozyten lokalisiert ist.

Festzuhalten bleibt, daß im Zuge dieser Arbeit die Kapillaren ebenfalls mechanisch isoliert wurden und eine deutliche, überwiegend luminal, Expression des P-Glykoproteins in den Kapillar-Endothelzellen zu erkennen ist. Auf Grund der Eigenschaft als Transportprotein stellt dies auch eine sinnvolle und logische Lokalisation dar.

3.3.2.3 Western Blot auf P-Glykoprotein

Der Western Blot ist ein Verfahren, bei dem Proteine in einem elektrischen Feld durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose Membran übertragen (= gebロットet) werden. Im Anschluß daran kann das Protein mittels markierter, spezifischer Antikörper nachgewiesen werden.

Neben der immunhistochemischen Färbung wurde der Western Blot als weiterer Nachweis für eine Exprimierung von P-Glykoprotein in frisch isolierten Kapillaren durchgeführt.

Als Positivkontrolle dienten Bürstensaum-Membranen des Intestinum, isoliert aus der Ratte. In diesen *Brush-border* Membranen wurde P-Glykoprotein schon mehrfach von anderen Arbeitsgruppen nachgewiesen (Thiebaut et al., 1987; Schinkel et al., 1994). Sie wurden daher als Positivkontrolle verwendet.

Nach dem Auftragen der Proben und Molekülgrößen-Standards wurde das Gel in ein elektrisches Feld gebracht. Die Proteine wurden nun durch unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit ihrer Größe bei einer konstanten Spannung aufgetrennt. Durch anschließendes Blotten bei konstanter Stromstärke wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran fixiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden über Nacht mit einer Milchpulver-Lösung geblockt.

Der Nachweis des P-Glykoproteins auf diesen Membranen erfolgte durch eine Inkubation mit dem Antikörper C219 (vgl. 3.3.2.2) und einem Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelten Sekundärantikörper mit anschließender ECL-Detektion. Das Prinzip der *enhanced chemiluminescence* (ECL) beruht darauf, daß eine Substanz durch eine chemische Reaktion in ihren energetisch angeregten Zustand überführt wird. Bei der Rückführung in den energetisch ärmeren Ausgangszustand wird die freigesetzte Energie in Form von Licht abgegeben. Eines der bestverstandenen und verwendeten Systeme ist die HRP/Wasserstoffperoxid gekoppelte Oxidation des Luminols in alkalischer Lösung. Hierbei wird, katalysiert durch das an den Sekundärantikörper gebundene Enzym HRP (Meerrettich-Peroxidase), Luminol oxidiert und in den energetisch angeregten Zustand versetzt. Durch Zugabe eines chemischen Verstärkers (*enhanced*), in der Regel Phenol, wird die Lichtausbeute vielfach verstärkt, so daß die Lumineszenz bis zu 60 min lang mittels eines Hyperfilms detektiert werden kann.

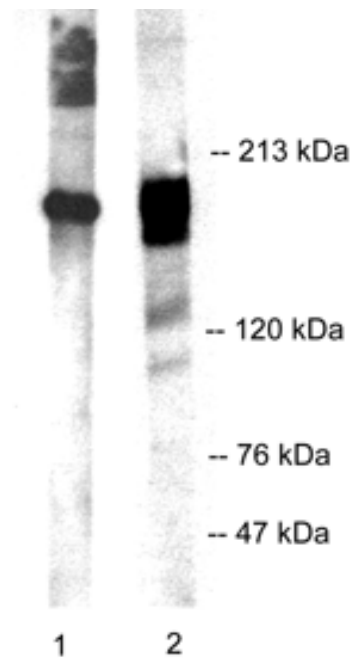


Abbildung 11: Western Blot auf P-Glykoprotein in isolierten Kapillaren (Linie 1) und Brush-border Membranen von der Ratte (Linie 2) mit dem P-Glykoprotein Antikörper C219

Wie auch von Regina et al. (1998) und Lechardeur und Scherman (1995) beschrieben, belegen die Ergebnisse des Western Blot eindeutig, daß P-Glykoprotein in frisch isolierten Kapillaren exprimiert wird.

3.3.2.4 Sekretionsversuche an isolierten Kapillaren

Durch immunhistochemische Färbungen und Western Blot konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß P-Glykoprotein in den isolierten Kapillaren exprimiert wird. Um aber eine mögliche Beeinflussung des Transports von Arzneistoffen an der Blut-Hirn Schranke durch P-Glykoprotein anhand dieses *in vitro*-Modells untersuchen zu können, mußte sichergestellt werden, daß P-Glykoprotein nicht nur in den frisch isolierten Kapillaren exprimiert, sondern zudem dort auch funktionell aktiv ist.

Dieser Nachweis wurde mit einem fluoreszenz-markierten, spezifischen Substrat des P-Glykoprotein (Bodipy-Verapamil) und mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie geführt.

Unter einem konfokalen Lasermikroskop (CLM) lassen sich im Gegensatz zu herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopen einzelne Ebenen des Präparates präzise fokussieren. Mit der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie können biologische Präparate optisch geteilt werden, ohne daß das Präparat physikalisch zerstört wird (Shotton und White, 1989). Man erhält zum einen durch eine bessere Auflösung schärfere Bilder, kann aber vor allem die Lokalisation von

fluoreszierenden Molekülen in lebenden Zellen untersuchen und daher exakte Fluoreszenz-Intensitätsmessungen durchführen. Durch dieses Verfahren ist es möglich, die Fluoreszenz-Intensität in einer ganz bestimmten Ebene zu messen, ohne daß störende Streufluoreszenz aus der Ebene darüber oder darunter in die Meßwerte miteinbezogen wird, wie es bei herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopen der Fall ist.

Werden die Kapillaren mit einer Lösung eines spezifischen, fluoreszierenden Substrates von P-Glykoprotein inkubiert, wird das Substrat von diesem Transportprotein erkannt und transportiert. Da Pgp an der luminalen Membran der Kapillar-Endothelzellen lokalisiert ist, bedeutet dies, daß das Substrat - auch entgegen einem Konzentrationsgefälle - aktiv von Pgp in das Lumen der Kapillare sekretiert wird. Dies entspricht *in vivo* einer Exkretion zurück ins Blut und damit einem Schutz des Gehirns vor dem Eindringen von Substanzen. Wird das Substrat von Pgp erkannt und ins Lumen sekretiert, reichert es sich im Lumen der Kapillaren an. Dies wiederum wird durch eine erhöhte Fluoreszenz-Intensität im Lumen gegenüber den Endothelzellen sichtbar.

Im Gegenzug sollte das Substrat bei einer Hemmung von P-Glykoprotein in deutlich geringerem Maße ins Lumen sekretiert werden. Die Kapillaren wurden daher - neben den Kontrollversuchen mit reiner Substrat-Lösung - auch mit einem Inhibitor bzw. einem anderen Substrat des P-Glykoproteins vorinkubiert, um damit Pgp zu blockieren.

Als spezifisches Substrat für P-Glykoprotein wurde fluoreszenz-markiertes Verapamil (Bodipy-Verapamil) gewählt, als Inhibitoren wurden Natriumcyanid und Loperamid verwendet. Verapamil wird als Calciumkanal-Blocker bei der Behandlung von Bluthochdruck eingesetzt und ist ein Substrat von P-Glykoprotein (Gottesman und Pastan, 1993; Ford und Hait, 1990; Fricker et al., 1999). Natriumcyanid (NaCN) ist ein metabolischer Inhibitor, der alle aktiven Transportprozesse lahmlegt, indem es in den Energiehaushalt der Zelle eingreift. Da P-Glykoprotein eine *efflux*-Pumpe ist, die aktiv - also unter Energieverbrauch - Substanzen transportiert, sollte nach Vorinkubation der Kapillaren in einer Natriumcyanid-Lösung eine deutlich verminderte Sekretion von Bodipy-Verapamil ins Lumen der Kapillaren festzustellen sein. Das Antidiarrhoikum Loperamid hat eine opiatähnliche Struktur, zeigt aber nahezu ausschließlich periphere opiatähnliche Effekte z.B. im Gastrointestinaltrakt. Pharmakologische Effekte im ZNS wurden bisher kaum beobachtet. Untersuchungen an *mdr1a* (-/-) Mäusen - das sind knockout Mäuse, die kein P-Glykoprotein exprimieren - haben eindeutig gezeigt, daß P-Glykoprotein in der Blut-Hirn Schranke einen Übergang von Loperamid vom Blut ins Gehirn verhindert und daher für das selektive (periphere) pharmakologische Verhalten von Loperamid verantwortlich ist (Schinkel et al., 1996).

Die Kapillaren wurden im Kontrollversuch für 20-25 min mit der Bodipy-Verapamil Lösung inkubiert (Endkonzentration 1 μ M) und anschließend unter dem konfokalen Mikroskop betrachtet.

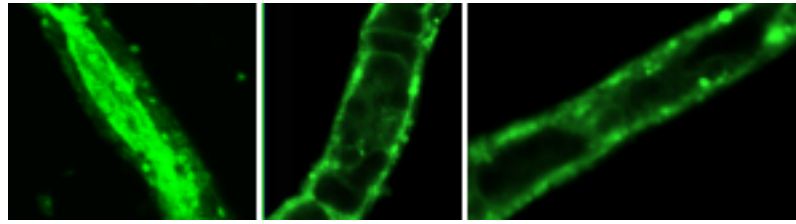


Abbildung 12: Inkubation der frisch isolierten Kapillaren mit 1 μ M Bodipy-Verapamil und Einfluß der Inhibitoren NaCN (1 mM) und Loperamid (10 μ M)

Man sieht deutlich, daß das Lumen mit fluoreszierendem Substrat gefüllt ist, Bodipy-Verapamil demnach ins Lumen sekretiert wird. Wurden die Kapillaren zuvor 20 min mit einer 1 mM Lösung von NaCN inkubiert, ist die Sekretion von Bodipy-Verapamil ins Kapillarlumen deutlich geblockt, einen ähnlichen Effekt erzielt man durch Vorinkubation mit dem P-Glykoprotein Substrat Loperamid (10 μ M, ebenfalls 20 min). Auch hier ist die Sekretion von Bodipy-Verapamil deutlich vermindert.

Eine Vorinkubation der Kapillaren mit der Lösung eines Mrp2 Substrates, Leukotrien C₄ (LTC₄, vgl. 3.3.3.4) zeigt keinen Einfluß, Mrp2 spielt also offensichtlich für die Exkretion von Bodipy-Verapamil keine Rolle.

Die am konfokalen Mikroskop aufgenommenen Bilder wurde anschließend mit einem Bildverarbeitungsprogramm (Scion Image, Version 3 β) ausgewertet. In mittleren Kapillarsegmenten (vgl. 2.2.6.2) wurde die durchschnittliche Fluoreszenz-Intensität sowohl in den Endothelzellen, also auch im Lumen der Kapillaren gemessen. Man erhält hieraus ein Lumen/Zell-Verhältnis bezüglich der Fluoreszenz-Intensität, daß im Falle einer Sekretion größer als eins, und im Falle einer gehemmten Sekretion kleiner als eins ist. Die gemessenen Werte innerhalb eines Versuches wurden gemittelt und das durchschnittliche Lumen/Zell-Verhältnis der Fluoreszenz-Intensität bestimmt (die Einzelwerte sind im Anhang aufgeführt).

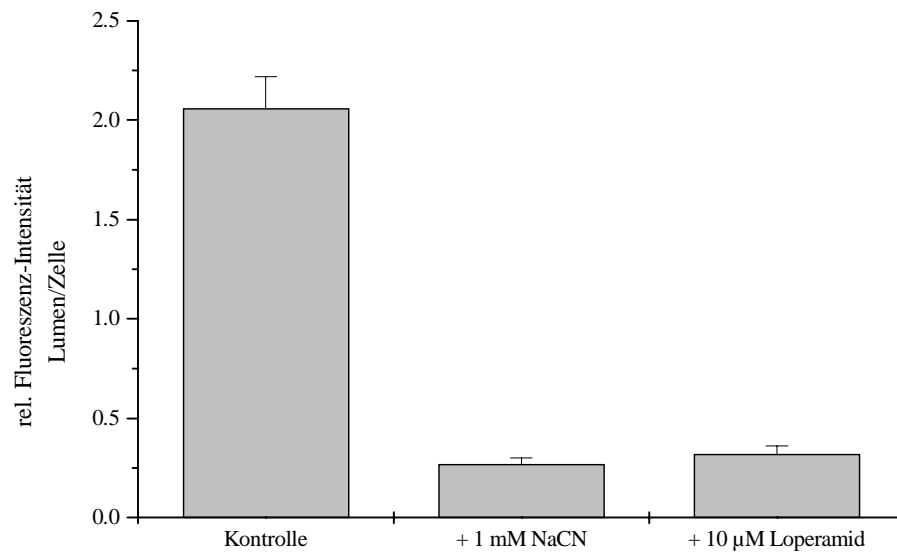


Abbildung 13: Relative Fluoreszenz-Intensitäts-Verhältnisse nach Inkubation der frisch isolierten Kapillaren mit 1 µM Bodipy-Verapamil sowie Einfluß von NaCN (1 mM) und Loperamid (10 µM)

Die immunhistochemischen Versuche, die Western Blot Experimente und die Untersuchungen am CLM mit spezifischen Antikörpern bzw. Substraten belegen eindeutig, daß P-Glykoprotein in den frisch isolierten Kapillaren nicht nur exprimiert, sondern auch funktionell aktiv ist.

Es steht hiermit ein *in vitro*-Modell der Blut-Hirn Schranke zur Verfügung, an dem insbesondere die Beteiligung von P-Glykoprotein an Transportprozessen von Arzneistoffen an der Blut-Hirn Schranke untersucht werden kann.

3.3.3 Multidrug resistance-related protein 2 - Mrp2

3.3.3.1 Allgemeines zu MRP

- Entdeckung von MRP

Die Überexprimierung von P-Glykoprotein ist eine der Ursachen, die zu einer *multidrug* Resistenz führen kann. Seit Ende der achtziger Jahre mehrten sich jedoch in der Literatur Berichte über *multidrug* resistente Zell-Linien, die – obwohl kein P-Glykoprotein überexprimiert wurde und daher als Ursache ausschied – dennoch ein ähnliches Resistenzmuster aufwiesen (Mirski et al., 1987; McGrath und Center, 1987; Reeve et al., 1990). Man vermutete daher neben der P-Glykoprotein Überexprimierung noch weitere Mechanismen als Ursache der *multidrug resistance* (MDR). Diskutiert wurden unter anderem z.B. eine vermehrte Exprimierung von Arzneistoff-abbauenden/entgiftenden Enzymen, eine

Veränderung der Topoisomerase oder eine erhöhte Exprimierung von bisher noch nicht näher charakterisierten Proteinen.

Auf der Suche nach eben diesen Proteinen, die verantwortlich für eine solche *multidrug resistance* in H69AR Zellen sein könnten, isolierten und sequenzierten Cole et al. 1992 geklonte cDNA, deren entsprechende mRNA wiederum vermehrt in den resistenten Zellen zu finden war, jedoch nicht in den sensitiven Parental-Zellen (Cole et al., 1992; Cole und Deeley, 1993). Diese mRNA codierte für ein 1531 Aminosäuren großes Protein, das *multidrug resistance related protein* (MRP) genannt wurde. In der Folgezeit wurde eine Überexprimierung dieses Proteins in einer Vielzahl von – aus verschiedenen Tumortypen abgeleiteten – selektierten Zell-Linien gefunden (Krishnamachary und Center, 1993; Zaman et al., 1993; Barrand et al., 1994). Die Arbeitsgruppe um Cole konnte dann auch 1994 zeigen, daß eine Überexprimierung von MRP zu *multidrug resistance* führen kann (Grant et al., 1994).

Lange bevor MRP (Mrp1) entdeckt wurde, ist die Anwesenheit eines organischen Anionen Transporters in der kanalikulären Membran von Hepatozyten beschrieben worden, der aber zum damaligen Zeitpunkt weder auf der Protein- noch der cDNA-Ebene näher charakterisiert war (Jansen et al., 1985; Huber et al., 1987; Kuipers et al., 1988; Oude Elferink und Jansen, 1994; Oude Elferink et al., 1995; Roelofsen et al. 1995a und 1997). Dieser Transporter war zunächst unter dem Namen *canalicular multispecific organic anion transporter* (cMoat) bekannt. Die Sequenzaufklärung sowie nachfolgend erste Ergebnisse über die Funktion von MRP (1) (Leier et al., 1994) ließen jedoch die Anwesenheit eines funktionell verwandten Transporters in anderen Geweben vermuten. Durch den Vergleich von Transportcharakteristika in Gallenmembran-Vesikeln aus der Ratte, sowie Vesikeln aus GY/TR⁻ und EHBR mutanten Rattenstämmen (vgl. 3.3.3.2) konnte letztlich Mrp2 (= cMOAT), die apikale Isoform von Mrp1 identifiziert und charakterisiert werden (Paulusma et al., 1996; Büchler et al., 1996). 1997 berichteten Kool et al. von 3 weiteren Mitgliedern, Mrp3-5, 1999 folgte Mrp6 (Kool et al., 1999). Mittlerweile sind sieben Mitglieder der MRP Familie beschrieben, allerdings ist Mrp7 noch nicht näher charakterisiert und auch über Mrp4-6 ist noch nicht sehr viel bekannt (Borst et al., 1999; Borst et al., 2000).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ging es insbesondere um die Exprimierung von Mrp2 und/oder Mrp1 an der Blut-Hirn Schranke, so daß im Folgenden nur noch auf diese zwei Mitglieder der MRP Familie eingegangen wird.

- Struktur

Da Mrp1 und Mrp2 Mitglieder der ABC-Transporter Familie sind (vgl. 3.3.1), finden sich auch hier mehrere hydrophobe Transmembrandomänen sowie cytosolische, ATP-bindende Domänen. Im Gegensatz zur Familie der P-Glykoproteine und anderen Vertretern der

ABC-Transporter ist die MRP Familie die erste Untergruppe, die drei statt der bisher bekannten zwei Bereiche mit Transmembrandomänen besitzen. Diskutiert werden 17 Transmembrandomänen mit einer zusätzlichen N-terminalen Domäne (TMD₀, vgl. Abbildung 9), die bei P-Glykoprotein ganz fehlt (Gao et al., 1998; Bakos et al., 1996; Tusnády et al., 1997).

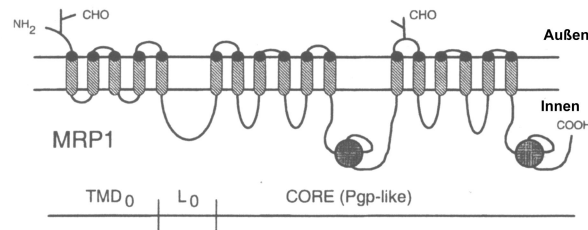


Abbildung 14: Schematische Darstellung des multidrug resistance-associated Protein (MRP), entnommen aus Borst et al., 1999

Mrp1 besteht aus 1531 Aminosäuren, Mrp2 setzt sich aus 1545 Aminosäuren zusammen und zeigt von den Mitgliedern der MRP Familie bezüglich der Aminosäuren die größte Homologie zu Mrp1: 49 % (Keppler und König, 1997; Borst et al., 1999). Die Identität der Aminosäuren zwischen MDR1 P-Glykoprotein und Mrp1 liegt lediglich bei 15 %, Mrp2 und P-Glykoprotein stimmen in 25 % der Aminosäuresequenz überein.

Sowohl Mrp1 als auch Mrp2 sind N-glykosyliert und haben ein Molekulargewicht von ca. 190 kDa.

- Substrate

Was die Substratspezifität betrifft, so sind sich Mrp1 und Mrp2/cMOAT trotz ihrer zum Teil unterschiedlichen Aminosäuresequenz sehr ähnlich. Es sind dies in der Hauptsache Glutathion-, Glucuronid- und Sulfatkonjugate. Die Rolle von Glutathion (GSH) selber als Substrat wird kontrovers diskutiert. Tamai und Tsuji gingen 1996 noch von einem Transport der reduzierten Form (GSH) aus, Arbeitsgruppen um Keppler und Cole fanden jedoch heraus, daß GSH selber nicht transportiert wird, es aber vermutlich als Co-Substrat für neutrale und kationische Substanzen dient (Keppler et al., 1997; König et al., 1999; Cole und Deeley, 1998). So werden z.B. die kationischen Krebsmedikamente Cisplatin, Vincristin, Etoposid und Methotrexat vermutlich als GS-X Konjugate von Mrp1/2 erkannt und transportiert (Borst et al., 2000; Loe et al., 1996; Draper et al., 1997). Hiermit im Zusammenhang steht auch der Begriff „GS-X Pumpe (*GSH S-conjugate export carrier*), der für Mrp1/2 gelegentlich verwendet wird (Müller et al., 1994; Kool et al., 1997; Borst et al., 2000).

Zu den Substraten von Mrp1 und Mrp2 zählen aber auch unkonjugierte, meist anionische Substanzen. So z.B. das β -Lactam Antibiotikum Cefodizim, der HMG-CoA Reduktase Hemmer Pravastatin, der ACE Hemmer Temocaprilat und viele weitere (Loe et al., 1996a; Kusuhara et al., 1998b)

Mrp1 und Mrp2 zeigen eine sehr ähnliches Spektrum an Substraten. Die Unterschiede in der Substratspezifität von Mrp1 und Mrp2 zeichnen sich eher durch unterschiedliche Affinitäten und Transportraten bei den einzelnen Substraten aus, als in den einzelnen Substraten selber (Keppler et al., 1997).

- Gewebeverteilung und Funktion

Bezüglich der Gewebeverteilung und Lokalisation unterscheiden sich Mrp1 und Mrp2 hingegen deutlich.

Mrp1 ist primär in der Plasmamembran lokalisiert, findet sich aber auch im Cytoplasma und in einigen Zellen kreisförmig um den Zellkern herum (Zaman et al., 1994; Loe et al., 1996). In der Plasmamembran polarisierter Zellen wird es auf der basolateralen Seite exprimiert (Cole et al., 1992; Flens et al., 1996; Evers et al., 1996; Roelofsen et al., 1997b)

Im Gegensatz zu P-Glykoprotein, das in der Leber, Niere und Darm an der Exkretion von Substanzen in die Galle, das intestinale Lumen und den Urin beteiligt ist und an der Blut-Hirn Schranke, den Testes und der Plazenta eine Schutzfunktion übernimmt, scheint Mrp1 eher ubiquitär verteilt zu sein. So findet man eine hohe Expression von Mrp1 z.B. in der Lunge, der Skelettmuskulatur und den Testes. Niedrigere Expressionen finden sich in der Leber, Niere, Herz, Milz, und Kolon (Flens et al., 1996; Cole et al., 1992; Barrand et al., 1997).

In kultivierten, resistenten Tumorzellen ist Mrp1 eher an der Zelloberfläche lokalisiert. Mrp1 agiert hier vergleichbar dem P-Glykoprotein als *drug efflux*-Pumpe und kann so zu einer *multidrug* Resistenz im Tumorgewebe führen (Zaman et al., 1994; Barrand et al., 1997; Lautier et al., 1996).

Über die physiologische Funktion von Mrp1 in gesundem Gewebe lassen sich zur Zeit nur Vermutungen anstellen. Da zwar Glutathion (GSH) selber kein Substrat von Mrp1, wohl aber die oxidierte Form (GSSG), wird eine Rolle bei der Abwehr von oxidativem Streß und eventuell bei der Aufrechterhaltung des intrazellulären Redox-Potential diskutiert (Keppler et al., 1997; Cole und Deeley, 1998). In den Testes übernimmt Mrp1 durch seine basolaterale/abluminale Anordnung in den Sertoli Zellen eine Schutzfunktion: Mrp1 pumpt potentiell schädliche Substanzen wieder aus den Zellen heraus und schützt so die Spermienzellen im Lumen der testikulären Tubuli (Borst et al., 2000). Auf die gleiche Weise wird das Eindringen von toxischen Substanzen in die Cerebrospinal-Flüssigkeit im Choroid Plexus verhindert (Wijnholds et al., 2000; Nishino et al., 1999; Rao et al., 1999).

Was die Lokalisation/Beteiligung von Mrp1 an der Blut-Hirn Schranke betrifft, so ist auch hier noch sehr wenig bekannt. In isolierten Kapillaren fand Seetharaman überhaupt kein Mrp1, sowohl Regina et al. (1998), als auch Zhang et al. (2000) fanden Mrp1 nur sehr schwach exprimiert, und auch Flens et al. (2000) konnten im Gehirn kein Mrp1 detektieren. In primärkultivierten Gehirn-Endothelzellen konnten Zangh und Regina Mrp1 jedoch nachweisen. Es lassen sich also bisher keine definitiv sicheren Angaben über ein Vorkommen respektive eine Abwesenheit von Mrp1 sowie eine mögliche Involvierung in den Arzneistoff-Transport an der Blut-Hirn Schranke machen, Mrp1 scheint aber in frisch isolierten Gehirnzellen nicht oder nur sehr schwach exprimiert zu werden.

Mrp2: ist hauptsächlich in der kanalikulären Membran der Hepatozyten lokalisiert. Außer in der Niere, dem Duodenum und Ileum konnte Mrp2 bisher jedoch in kaum einem weiteren Gewebe nachgewiesen werden (Paulusma et al., 1996; Schaub et al., 1997; Büchler et al., 1996). So ist auch seine physiologische Funktion, abgesehen von der Beteiligung an der Exkretion von Substanzen in die Galle und am Transport von Xenobiotika über die apikale Membran der proximalen Nieren-Tubuli, weitestgehend unbekannt.

Durch die breite Substratspezifität von Mrp1 und Mrp2 wird über eine mögliche Rolle bei der Detoxifizierung von endogenen und exogenen Substanzen, Arzneistoffen und Karzinogenen diskutiert: in der Phase I und II werden diese teilweise durch Monooxygenasen und Transferasen in Konjugate überführt, die zum Teil wiederum Substrate von Mrp1 und Mrp2 darstellen. Die Exkretion über Mrp2 käme somit quasi einer Phase III des Metabolismus gleich (Keppler et al., 1997; König et al., 1999).

Denkbar ist daher auch, daß Mrp2 in Analogie zu P-Glykoprotein auf Grund seiner apikalen Lokalisation in polarisierten Zellen als *drug efflux*-Pumpe eine wichtige Rolle bei Transportprozessen von Arzneistoffen – z.B. an der Blut-Hirn Schranke – spielen könnte.

Bisher war jedoch unklar bzw. in der Literatur kontrovers diskutiert, ob neben P-Glykoprotein auch andere Mitglieder der ABC-Transporter Familie ebenfalls an Transportprozessen an der Blut-Hirn Schranke beteiligt sind. Vermutungen, daß Mitglieder der MRP-Familie involviert sind, ließen sich bisher lediglich aus Versuchen mit Membranvesikeln, die aus einer Gehirn-Endothelzell-Linie (MBEC4, Kusuhara et al., 1998a) präparierten wurden, oder mit kultivierten Gehirn-Endothelzellen ableiten (Regina et al., 1998; Huai Yun et al., 1998). Hier ging es aber überwiegend um Mrp1 und weniger um Mrp2. Zudem scheint Mrp1 in frisch isolierten Zellen nur in geringem Maße exprimiert zu werden, und erst vermehrt im Verlauf der Kultivierung aufzutreten (Regina et al., 1998; Seetharaman et al., 1998). Kultivierte Gehirn-Endothelzellen scheinen demnach für Untersuchungen über eine mögliche Beteiligung von Mitgliedern der MRP-Familie an der Blut-Hirn Schranke weniger geeignet zu sein. Daher wurden frisch isolierte Kapillaren aus dem Gehirn von Schweinen als *in vitro*-Modell für die Untersuchung dieser Fragestellung herangezogen.

Da also Mrp1 in frisch isolierten Kapillaren und Zellen – wenn überhaupt – nur in sehr geringem Maße exprimiert wird, eine Beteiligung an dortigen Transportprozessen also eher von untergeordneter Bedeutung ist, ging es zunächst einmal darum, ob Mrp2 in isolierten Schweinehirn-Kapillaren exprimiert wird. In Analogie zu P-Glykoprotein wurden hierfür immunhistochemische Färbungen und Western Blot Experimente mit spezifischen Antikörpern, sowie funktionelle Untersuchungen am CLM durchgeführt.

3.3.3.2 Immunfärbung von Mrp2

Der immunhistochemische Nachweis von Mrp2 in isolierten Kapillaren erfolgte wie für P-Glykoprotein unter 3.3.2.2 beschrieben. Da aber in der Literatur, wie oben ausgeführt, die Exprimierung von Mrp, insbesondere Mrp1, an der Blut-Hirn Schranke sehr kontrovers diskutiert wird, wurden zur Sicherheit zwei verschiedene Antikörper gegen Mrp2 verwendet. Dies war zum einen das Antiserum K13, das gegen die letzten 11 Aminosäuren des C-terminalen Endes von Ratten-mrp2 gerichtet ist (Arbeitsgruppe Dr. Peter Meier, Zürich). Dieser Antikörper zeigt keine Kreuzreaktivität gegenüber Mrp1 und Mrp6, seine Reaktivität gegenüber Mrp3-5 wurde bisher noch nicht getestet. Als weiterer, spezifischer Antikörper wurde der monoklonale Antikörper gegen menschliches cMoat/Mrp2 (M₂ III-6) der Firma Alexis verwendet. Die Spezifität dieses Antikörpers für Mrp2 wurde von einer Arbeitsgruppe speziell sowohl für die Anwendung im Western Blot als auch in Immunfärbungen nachgewiesen (Scheffer et al., 2000). Er zeigt insbesondere keine Kreuzreaktivität gegenüber P-Glykoprotein, Mrp1, Mrp3 und Mrp5.

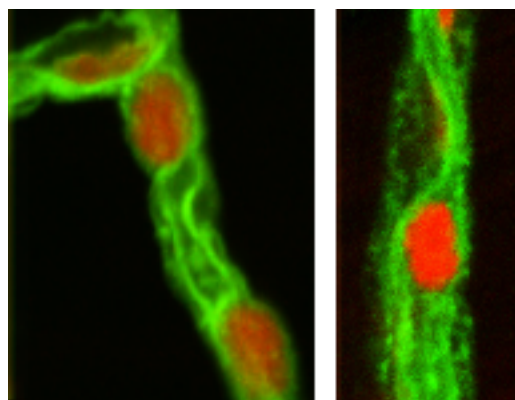


Abbildung 15: Immunhistochemische Färbungen isolierter Kapillaren mit zwei spezifischen Mrp2-Antikörpern, links das Antiserum K13 gegen Ratten-mrp2, rechts der M₂ III-6 Antikörper der Firma Alexis. Die Zellkerne wurden mit Propidiumjodid rot angefärbt

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung belegen eindeutig ein Vorhandensein von Mrp2 in den isolierten Kapillaren. Mit beiden Antikörpern ist im Vergleich zur Negativkontrolle eine deutliche Anfärbung von Mrp2 an der luminalen Membran sichtbar.

Zur Kontrolle, wurde der spezifische Mrp2 Antikörper M₂ III-6 auch an sogenannten TR⁻ Ratten, getestet. Diese TR⁻ Ratten exprimieren aufgrund einer Genmutation kein cMoat/Mrp2 und zeigen daher einen dem menschlichen Dubin-Johnson Syndrom sehr ähnlichen Phänotyp (Dubin und Johnson, 1954; Oude Elferink und Jahnsen, 1994; Paulusma und Oude Elferink, 1997). Sie werden neben zwei anderen Rattenstämmen, den GY (*Groningen yellow*) Ratten und den EHBR (*Eisai hyperbilirubinemic*) Ratten als Tiermodelle des menschlichen Dubin-Johnson Syndroms eingesetzt. Dieses Syndrom wird beim Menschen durch einen erblichen Defekt bei der Sekretion von amphiphilen und anionischen Konjugaten aus den Leberzellen in die Galle verursacht. Die betroffenen Patienten zeigen aufgrund des Fehlens von Mrp2/cMoat eine konjugierte Hyperbilirubinämie (Keppler und Kartenbeck, 1996; Keppler et al., 1997; Paulusma und Oude Elferink, 1997). In den TR⁻ Ratten wird also nachweislich kein Mrp2 exprimiert, P-Glykoprotein und Mrp1 hingegen schon (Keppler et al., 1997).

Die Ergebnisse der immunhistochemische Färbung von isolierten Gehirn-Kapillaren aus diesen TR⁻ Ratten bestätigen dies. Werden die Kapillaren mit dem spezifischen Mrp2 Antikörper inkubiert, so ist kein Unterschied zur Negativkontrolle zu erkennen, der P-Glykoprotein Nachweis hingegen ist eindeutig positiv. Dadurch konnte auch gezeigt werden, daß der verwendete Antikörper für den spezifisch Nachweis von Mrp2 eingesetzt werden kann. Die positive Färbung der isolierten Schweinehirn-Kapillaren mit diesem Antikörper ist daher ein eindeutiger Nachweis für Mrp2 in den hier isolierten Kapillaren.

3.3.3.3 Western Blot

Neben dem immunhistochemischen Nachweis konnte die Exprimierung von Mrp2 in frisch isolierten Gehirn-Kapillaren auch mit Hilfe eines Western Blot eindeutig nachgewiesen werden. Der Nachweis wurde analog dem P-Glykoprotein Nachweis geführt (vgl. 3.3.2.3). Lediglich die Probenaufarbeitung und die Gelelektrophorese wurden leicht modifiziert. Isolierte Bürstensaum-Membranen aus dem Intestinum der Ratte dienten erneut als Positivkontrolle (Van Aubel et al., 2000a; Paulusma et al., 1996; Büchler et al., 1996)

Da die Expression von MRP an der Blut-Hirn Schranke kontrovers diskutiert wird (vgl. 3.3.3.1), wurden auch hier zwei verschiedene, spezifische Antikörper gegen Mrp2/cMoat verwendet: Zum einen der bereits für die immunhistochemischen Färbungen eingesetzte monoklonale Antikörper gegen menschliches cMoat/Mrp2 (M₂ III-6) der Firma Alexis. Zum anderen das Antiserum k78mrp2, das gegen die 159 carboxy-terminalen Aminosäuren von Ratten Mrp2 gerichtet ist und dessen Spezifität gegenüber Mrp2 im Western Blot und in Immunfärbungen nachgewiesen wurde (Van Aubel et al., 1998; Masereeuw et al., 2000).

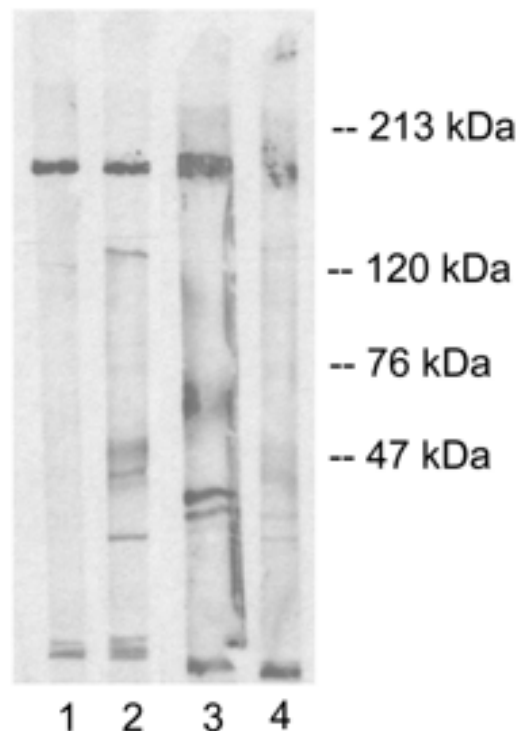


Abbildung 16: Western Blot auf Mrp2 mit isolierten Gehirn-Kapillaren (Linie 2 und 4) sowie Brush-border Membranen von der Ratte (Linie 1 und 3). Detektion mit k78mrp2 (Linie 1 und 2) bzw. mit Anti-cMoat/Mrp2 (M₂ III-6), Linie 3 und 4

Die Ergebnisse der Western Blot Experimente mit den zwei spezifischen Mrp2-Antikörpern zeigen deutlich ein ca. 190 kDa großes Protein. Mrp2 wird also in frisch isolierten Schweinehirn-Kapillaren exprimiert.

3.3.3.4 Sekretionsversuche am CLM

Sowohl durch die immunhistochemischen Färbungen als auch die Western Blot Experimente konnte nachgewiesen werden, daß Mrp2 in den isolierten Schweinehirn-Kapillaren exprimiert wird. Um aber anhand dieses *in vitro*-Modells untersuchen zu können, ob dieser ABC-Transporter ebenfalls an Transportprozessen an der Blut-Hirn Schranke beteiligt ist, mußte zunächst in Analogie zu P-Glykoprotein nachgewiesen werden, daß Mrp2 in den frisch isolierten Kapillaren nicht nur exprimiert, sondern auch funktionell als *drug efflux*-Pumpe aktiv ist. Für Mrp2 wäre dann – vergleichbar dem P-Glykoprotein - eine Beteiligung an der Schutzfunktion des Gehirns denkbar. Es könnte den Transport von Arzneistoffen an der Blut-Hirn Schranke beeinflussen und damit Ursache für die geringe ZNS-Verfügbarkeit mancher dieser Arzneistoffe sein.

In Analogie zum funktionellen Nachweis von P-Glykoprotein wurden daher Sekretionsversuche mit spezifischen Substraten bzw. Hemmstoffen von Mrp2 unter dem konfokalen Lasermikroskop (CLM) durchgeführt. Als fluoreszierendes Substrat, das - auch entgegen einem Konzentrationsgefälle - aktiv von Mrp2 ins Lumen der Kapillaren sekretiert werden soll, wurde Fluoreszein-Methotrexat (Fl-Mtx) verwendet. Neben den Kontrollversuchen mit reiner Substrat-Lösung wurden die Kapillaren, um Mrp2 zu blockieren, zudem mit einem Inhibitor (NaCN) bzw. einem weiteren, spezifischen Substrat von Mrp2 (LTC₄) vorinkubiert. Anschließend wurden noch Versuche durchgeführt, die zeigen sollten, daß P-Glykoprotein keinen Einfluß auf die Sekretion von Fl-Mtx hat.

Fluoreszein-Methotrexat (Fl-Mtx) ist ein fluoreszierendes organisches Anion mit einem Molekulargewicht von 979 g/mol. In Versuchen an renalen, proximalen Tubuli konnte nachgewiesen werden, daß Fl-Mtx, nachdem es über einen Na-unabhängigen Transporter in die Zellen der Tubuli aufgenommen wurde, aktiv über Mrp2 ins Lumen sekretiert wurde (Masereeuw et al., 1996 und 2000; Fricker et al., 1999). Versuche mit Membranvesikeln aus Mrp2 überexprimierenden Zellen, sowie Transportuntersuchungen an Tubuli der Rektaldrüse des Hai belegen ebenfalls, daß Fl-Mtx über Mrp2 transportiert wird (van Aubel et al., 1998; Miller et al., 1998).

Leukotrien C₄ (LTC₄) ist ein Arachidonsäurederivat, das durch die LTC₄-Synthase aus Glutathion und LTA₄ synthetisiert wird. Physiologisch gesehen ist LTC₄ ein potenter Entzündungsmediator, der an einer Reihe von Rezeptor-vermittelten Signal-Transduktionswegen, z.B. bei der Kontrolle der Gefäßpermeabilität und Kontraktion der glatten Muskulatur, beteiligt ist (Loe et al., 1996b). Dieses endogene Glutathion-Derivat ist nicht nur ein spezifisches Substrat von Mrp1/2, sondern hat unter den bisher bekannten Substraten von Mrp2 auch die höchste Affinität (Loe et al., 1996b; Jedlitschky et al., 1996; Müller et al., 1994; Leier et al., 1994; Gao et al., 1998; Keppler et al., 1997). So zeigen z.B. auch TR⁻ Ratten (vgl. 3.3.3.2) eine stark verminderte hepatische Exkretion dieses Glutathion-Konjugates, da sie kein Mrp2 in ihren kanalikulären Hepatozyten-Membranen exprimieren (Huber et al.; 1987; Ishikawa et al., 1990).

Für die Kontrollversuche wurden die frisch isolierten Gehirn-Kapillaren mit der reinen Substratlösung für ca. 25 min inkubiert und anschließend unter dem konfokalen Lasermikroskop auf Sekretion hin untersucht.

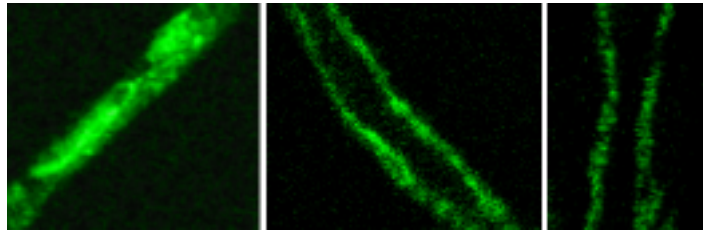


Abbildung 17: Isolierte Kapillaren inkubiert mit 1 μ M FI-Mtx. Einfluß von NaCN (1 mM) sowie LTC₄ (0,3 μ M) auf die Sekretion von FI-Mtx

Man erkennt deutlich eine Sekretion des fluoreszierenden Mrp2 Substrates FI-Mtx ins Lumen der Kapillare. Eine 20 minütige Vorinkubation mit dem metabolischen Inhibitor NaCN hemmt die Anreicherung von FI-Mtx im Lumen vollständig. Es handelt sich also bei der Sekretion von FI-Mtx über die luminale Membran der Kapillaren um einen aktiven, Energie benötigenden Transportprozeß.

Werden die Kapillaren zuvor 20 min mit einer 0,3 μ M Lösung des Mrp2 Substrates LTC₄ inkubiert – ist Mrp2 also quasi durch den Transport von LTC₄ „blockiert“ – kann FI-Mtx nicht mehr gleichzeitig von Mrp2 über die luminale Membran der Kapillaren sekretiert werden. Nach Vorinkubation mit LTC₄ findet keine Anreicherung des fluoreszierenden Mrp2 Substrates FI-Mtx im Lumen der Kapillaren statt.

Dies zeigt sich auch, wenn man die gemessenen Fluoreszenz-Intensitäten in den Lumina mit denen in den Endothelzellen vergleicht. Bei dem Kontrollversuch, also der Inkubation nur mit FI-Mtx, zeigt sich die Sekretion und Anreicherung im Lumen durch ein relatives Lumen/Zell-Verhältnis, daß weit größer als 1 ist. Vorinkubation mit NaCN oder LTC₄ ergeben relative Lumen/Zell-Verhältnisse deutlich kleiner als 1. In der nachfolgenden Abbildung sind beispielhaft die Ergebnisse einer Versuchsreihe graphisch dargestellt. Die Einzelwerte sowie die Ergebnisse der anderen Versuchsreihen sind im Anhang tabellarisch aufgeführt.

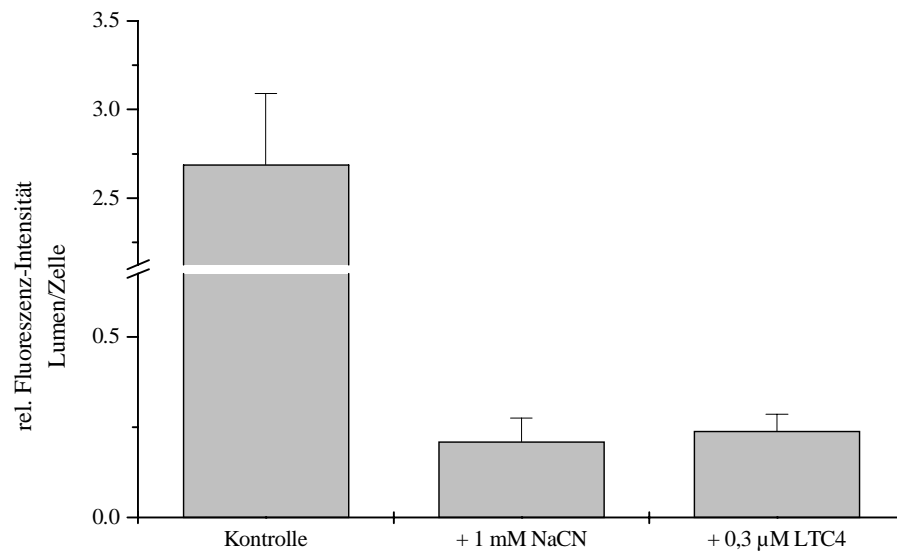


Abbildung 18: Relative Fluoreszenz-Intensitäts-Verhältnisse nach Inkubation der frisch isolierten Kapillaren mit 1 µM FI-Mtx sowie Einfluß der Inhibitoren NaCN (1 mM) und LTC₄ (0,3 µM).

Die Ergebnisse der Sekretionsversuche mit FI-Mtx, NaCN und LTC₄ zeigen eindeutig, daß das Exportprotein Mrp2 in den frisch isolierten Gehirn-Kapillaren nicht nur exprimiert wird, sondern auch funktionell aktiv ist.

Um einen Einfluß von P-Glykoprotein auf die Sekretion von FI-Mtx an den isolierten Kapillaren sicher auszuschließen, wurden die Kapillaren zusätzlich mit spezifischen Hemmstoffen bzw. Substraten des P-Glykoproteins vorinkubiert (Loperamid, Verapamil und PSC 833). Die Sekretion von FI-Mtx durch Mrp2 ins Lumen der Kapillaren sollte dadurch grundsätzlich nicht beeinflußt werden; abgesehen von geringen Schwankungen, die bei der Verwendung von biologischem Material immer möglich sind.

Das P-Glykoprotein Substrat Loperamid wurde bereits unter 3.3.2.4 näher beschrieben.

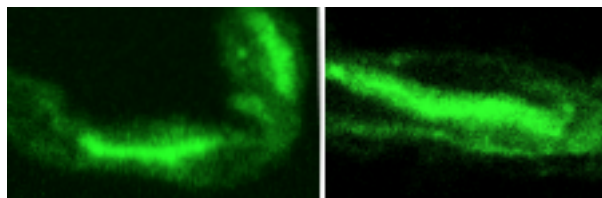


Abbildung 19: Inkubation der frisch isolierten Kapillaren mit 2 µM Fluoreszein-Methotrexat (FI-Mtx) sowie Einfluß des P-Glykoprotein Substrates Loperamid (10 µM) auf die Sekretion von FI-Mtx

Auch nach 20 minütiger Vorinkubation der isolierten Kapillaren mit dem P-Glykoprotein Substrat Loperamid kann man eine deutliche Sekretion von Fl-Mtx ins Lumen der Kapillare erkennen. Der aktive Transport von Fl-Mtx über die luminale Membran der Endothelzellen wird also nicht durch P-Glykoprotein beeinflusst. Es handelt sich hierbei vielmehr um eine von Mrp2 vermittelte Sekretion. Dies spiegelt sich – auch nach einer 20 minütigen Vorinkubation mit 10 μ M Loperamid – in einem nahezu unveränderten Lumen/Zell Verhältnis der Fluoreszenz-Intensitäten wieder. In nachfolgender Abbildung ist das Ergebnis einer Versuchsreihe graphisch dargestellt. Die aus je 10 Kapillaren vermessenen und gemittelten Einzelwerte der relativen Fluoreszenz-Intensitäten sowie die Ergebnisse der übrigen Versuchsreihen sind im Anhang tabellarisch aufgeführt.

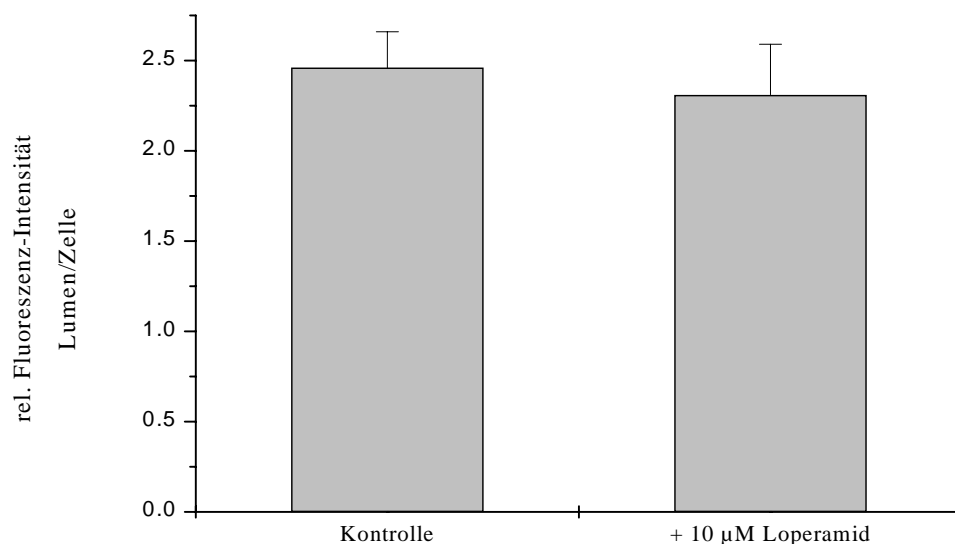


Abbildung 20: Relatives Fluoreszenz-Intensitäts-Verhältnis nach Inkubation der frisch isolierten Kapillaren mit 2 μ M Fl-Mtx sowie Einfluß des P-Glykoprotein Substrates Loperamid (10 μ M)

Durch eine Reihe von P-Glykoprotein-Inhibitoren wie z.B. Verapamil und Cyclosporin A (vgl. 3.4.2) kann *in vitro* eine durch Pgp Überexprimierung verursachte *multidrug resistance* (MDR) umgangen werden. Diese Substanzen hemmen P-Glykoprotein und blockieren dadurch den durch P-Glykoprotein verursachten Efflux z.B. eines Zytostatikums. Man spricht auch von sogenannten *reversal agents* bezüglich P-Glykoprotein verursachter MDR (Boesch et al., 1991; Twentyman, 1992; Cole et al., 1994; Slater et al., 1986). Die klinische Anwendung dieser MDR Modulatoren ist jedoch aufgrund ihrer eigenen pharmakologischen Wirkung stark eingeschränkt (Mason et al., 1990; Mason 1989).

Um dieses Problem zu umgehen, wurde PSC 833, ein nicht-immunsuppressives und weniger nephrotoxisches/hepatotoxisches Analogon des Cyclosporin A, entwickelt. Es unterscheidet sich von diesem nur in zwei der elf Aminosäuren, zeigt aber in P-Glykoprotein überexprimierenden Zellen eine 10 mal so große Effektivität (Boesch et al., 1991). PSC 833 ist eines der potentesten, bekannten *MDR reversal* Substanzen (Arachinal-Mattheis et al., 1995; Keller et al., 1992; Twentyman und Bleehen, 1991; Boesch und Loor, 1994; Desrayaud et al., 1998). Der klinische Einsatz von PSC 833 als *reversal agent* bei der Behandlung verschiedener Tumore ist bisher sehr vielversprechend, da er es ermöglicht, die Dosis des Zytostatikums deutlich zu senken (Fracasso et al., 2000; Boote et al., 1996; Raderer und Scheithauer, 1993).

PSC 833 ist also ein sehr potenter Inhibitor von P-Glykoprotein, beeinflusst aber Mrp1/2 vermittelte Transportprozesse nicht, oder allenfalls nur sehr geringfügig (Keppler et al., 1998; Leier et al., 1994; Barrand et al., 1993). PSC 833 kann daher als spezifischer Inhibitor von P-Glykoprotein bei der Untersuchung von Transportprozessen an der Blut-Hirn Schranke eingesetzt werden.

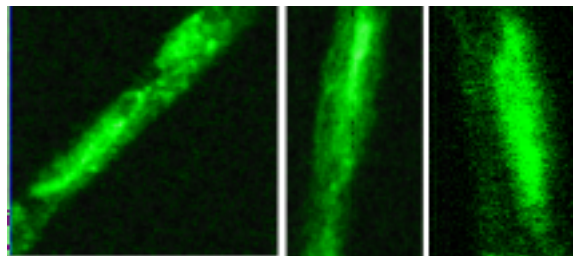


Abbildung 21: Inkubation der frisch isolierten Kapillaren mit 1 μ M Fluoreszein-Methotrexat (FI-Mtx) sowie Einfluß durch Vorinkubation mit den P-Glykoprotein Hemmstoffen Verapamil (50 μ M) oder PSC 833 (10 μ M)

Es ist deutlich zu erkennen, daß FI-Mtx auch nach 20 minütiger Vorinkubation mit den beiden P-Glykoprotein Hemmstoffen Verapamil und PSC 833 unverändert in das Lumen der isolierten Kapillaren sekretiert wird. P-Glykoprotein hat, wie auch bereits mit Loperamid gezeigt, keinen Einfluß auf die Sekretion von FI-Mtx über die luminal Membran der Gehirn-Endothelzellen. Daher bleiben auch die Lumen/Zell-Verhältnisse bezüglich der gemessenen Fluoreszenz-Intensitäten nahezu konstant. In nachfolgender Abbildung sind wieder beispielhaft die Ergebnisse einer Versuchsreihe graphisch dargestellt. Die Einzelwerte sowie die Ergebnisse der anderen Versuchsreihen sind in den Tabellen im Anhang aufgelistet.

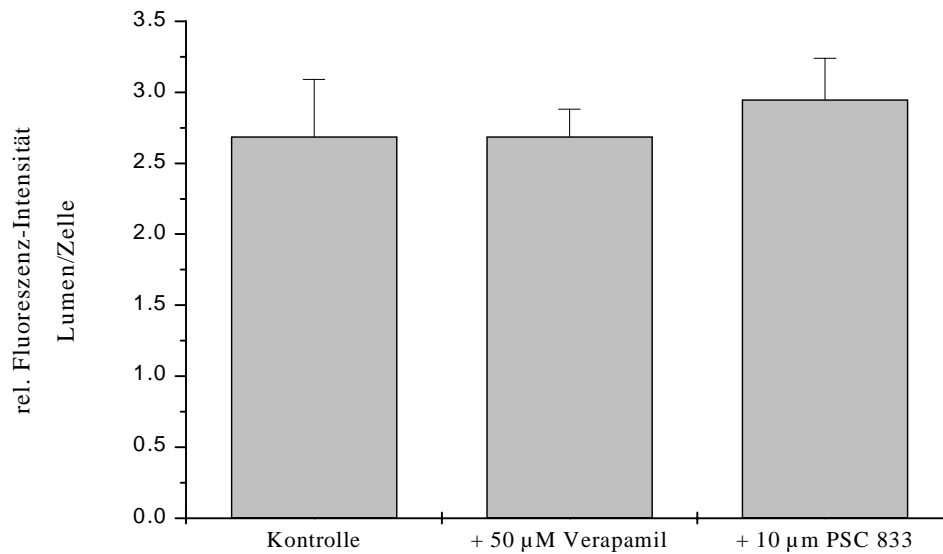


Abbildung 22: Relatives Fluoreszenz-Intensitäts-Verhältnis nach Inkubation der frisch isolierten Kapillaren mit 1 µM FI-Mtx sowie Einfluß der P-Glykoprotein Inhibitoren Verapamil (50 µM) und PSC 833 (10 µM)

Die immunhistochemischen Färbungen mit spezifischen Mrp2 Antikörpern sowie Western Blot Experimente mit frisch isolierten Kapillaren konnten eindeutig belegen, daß Mrp2 in den isolierten Kapillaren exprimiert wird. Durch die Sekretionsuntersuchungen am konfokalen Lasermikroskop konnte weiterhin gezeigt werden, daß Mrp2 nicht nur exprimiert, sondern auch funktionell aktiv ist: Werden die frisch isolierten Kapillaren mit einem fluoreszierenden Mrp2 Substrat (Fluoreszein-Methotrexat) inkubiert, kann man nach einigen Minuten eine beginnende Sekretion dieser Substanz über die luminalen Membran und damit eine Anreicherung im Lumen der Kapillaren erkennen, die nach ca. 20 min einen *steady state* erreicht. Werden die Kapillaren mit einem weiteren, spezifischen Substrat von Mrp2, dem LTC₄, einige Zeit vorinkubiert – ist das Transportprotein Mrp2 also quasi belegt – findet eine deutlich verminderte Sekretion von FI-Mtx statt. Demgegenüber zeigen spezifische Substrate bzw. Hemmstoffe des P-Glykoproteins keinerlei Effekt auf die Sekretion von FI-Mtx über die luminalen Membran der Endothelzellen. Ein Einfluß von P-Glykoprotein auf die Sekretion von FI-Mtx an der Blut-Hirn Schranke kann demnach ausgeschlossen werden.

Gleichzeitig konnte durch die Versuche aber vor allem gezeigt werden, daß das Transportprotein Mrp2 in frisch isolierten Kapillaren an der luminalen Membran der – die Blut-Hirn Schranke bildenden – Endothelzellen exprimiert und funktionell aktiv ist.

Zwischenergebnis:

Mit dem *in vitro*-Modell der (mechanisch) frisch isolierten Kapillaren sowie der konfokalen Laser Mikroskopie steht somit ein probates Modell für Untersuchungen des Arzneistoff-

transportes an der Blut-Hirn Schranke, insbesondere im Hinblick auf einen möglichen Einfluß der sekretorischen Transportproteine P-Glykoprotein und Mrp2, zur Verfügung.

Nachfolgend werden anhand dieses *in vitro*-Modells die zwei Arzneistoffe Ivermectin und Octreotid auf ihr Transportverhalten an der Blut-Hirn Schranke sowie auf eine eventuelle Beteiligung von P-Glykoprotein und/oder Mrp2 hin untersucht.

3.4 Einfluss von P-Glykoprotein und/oder Mrp2 auf den Transport von Ivermectin an der Blut-Hirn Schranke

3.4.1 Grundlegendes zu Ivermectin

Ivermectin ist das semisynthetische 22,23-dihydro-Derivat des Avermectin B1a/b, eines komplexes makrozyklischen Lacton, das von dem Actinomyceten *Streptomyces avermitilis* produziert wird.

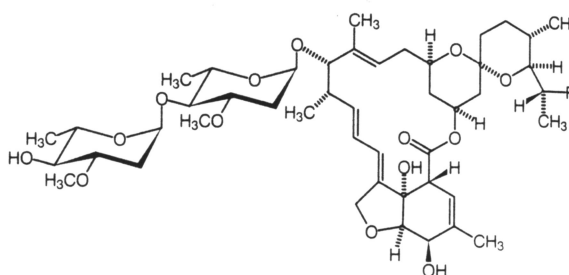


Abbildung 23: Molekulare Struktur der Ivermectine (B1a: R = C₂H₅; B1b: R = CH₃)

Es besitzt ein breites Aktivitäts-Spektrum gegenüber Fadenwürmern (Nematoden), Spinnentieren (Arachniden), zu denen auch Milben zählen, und parasitären Insekten. Ivermectin kommt daher bei der Kontrolle und der Behandlung einer Reihe von parasitären Infektionen, meist Tropenkrankheiten, sowohl beim Mensch als auch beim Tier zum Einsatz. So ist Ivermectin beispielsweise Mittel der Wahl bei der Behandlung der Flußblindheit beim Menschen, einer Krankheit, die durch einen parasitären Nematodenwurm verursacht wird (Campbell, 1984; Campbell et al., 1985, Hougard et al., 1994, Ottesen und Campbell, 1994). Das scheinbare Verteilungsvolumen von mehr als 47 l sowie die lange Halbwertszeit von ca. 35 Stunden scheinen bedingt durch die hohe Lipophilie und damit einer hohen Proteinbindung von Ivermectin im Plasma (Ette et al., 1990 und Baraka et al., 1996). Nach Gabe von Ivermectin erscheint es vor allem in der Niere, sowie im Fett- und Lebergewebe; im Gehirn jedoch konnten Chiu et al. (1988) nur geringste Mengen wiederfinden.

Ivermectin ist zwar bekannt für seine relativ hohe Wirksamkeit und seine vergleichbar geringe Toxizität, aber es traten gelegentlich auch Nebenwirkungen, insbesondere zentralnervöse Störungen, auf (Schinkel et al., 1994; Fricker et al., 1999).

Durch Zufall entdeckten Schinkel et al. 1994 eine mögliche Erklärung hierfür: *Mdr1a*(-/-) Mäuse, also *knock out* Mäuse, die kein P-Glykoprotein exprimieren, zeigten eine extreme Empfindlichkeit gegenüber Ivermectin. Schinkel besprühte die Mäuse mit einer verdünnten Lösung von Ivermectin, um sie gegen eine Milbenplage zu behandeln. Dies ist eine an sich ungefährliche Methode, auch wenn die Mäuse durch Lecken ihres Fells gelegentlich einen Teil der applizierten Ivermectindosis aufnehmen. In diesem Fall jedoch stellte sich heraus, daß ein Teil der Mäuse – und zwar lediglich die *knock out* Mäuse – bereits nach kurzer Zeit starben. Im Gehirn dieser P-Glykoprotein-defizienten Mäuse stellte er nach einer oralen Gabe von Ivermectin eine 87 fach höhere Konzentration als im Gehirn normaler Mäuse fest. Schinkel et al. schlossen daraus, daß P-Glykoprotein an der Blut-Hirn Schranke eine wichtige Rolle bei der Regulation der Verteilung von Ivermectin im Gehirn spielt. Das Fehlen von P-Glykoprotein scheint die Ursache der erhöhten Toxizität von Ivermectin in diesen *knock out* Mäusen zu sein.

Schinkel et al. sahen hierin auch eine mögliche Erklärung, warum einige Collie-Rassen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Ivermectin zeigten (Seward, 1983; Pulliam et al., 1985; Paul et al. 1987). Er vermutete, daß diese Hunde einen ähnlichen Gendefekt bezüglich P-Glykoprotein wie die *mdr1a*(-/-) Mäuse aufwiesen, was vor kurzem bestätigt wurde (Roulet et al., 2001).

Mäuse, die vor der Gabe von Ivermectin mit dem P-Glykoprotein Inhibitor PSC 833 behandelt wurden, zeigten ebenfalls ZNS-Nebenwirkungen (Didier und Loor, 1995). Und eine Subpopulation von CF-1 Mäusen, die analog den *mdr1a*(-/-) Mäusen kein Pgp exprimieren, zeigten gegenüber Ivermectin ebenfalls eine erhöhte Empfindlichkeit (Lankas et al., 1997). Daß Ivermectin mit dem membrangebundenen P-Glykoprotein interagiert, konnten auch Pouliot et al. (1997) sowie Rose et al. (1998) zeigen. Letztere untersuchten anhand einer Primärkultur von Endothelzellen aus dem Rind (BMECs) den Einfluß von Ivermectin auf die Aufnahme des P-Glykoprotein Substrates Rhodamin 123.

Sowohl Untersuchungen an einem Zellkultur-Modell aus polarisierten Nieren-Epithelzellen als auch an isolierten proximalen Nierentubuli von Killifischen ergaben, daß Ivermectin auch hier als Substrat von P-Glykoprotein transportiert wird (Schinkel et al., 1995; Fricker et al., 1999). Letztere konnten zudem zeigen, daß Bodipy-Ivermectin, ein fluoreszierendes Derivat von Ivermectin, über die basolaterale Membran per Diffusion in die Epithelzellen gelangt und von dort aus ebenfalls durch P-Glykoprotein über die luminalen Membran ins Lumen der Tubuli sekretiert wird.

Mit Hilfe des *in vitro*-Modells der frisch isolierten, morphologisch und funktionell intakten Gehirn-Kapillaren und des fluoreszierenden Derivates von Ivermectin, dem Bodipy-Ivermectin, bestand somit zum ersten Mal die Möglichkeit, in einem intakten Gefäßverband den Einfluß von P-Glykoprotein auf den Transport von Ivermectin an der Blut-Hirn Schranke zu untersuchen.

3.4.2 Sekretionsversuche am CLM

Die Versuche wurden anlog den Sekretionsuntersuchungen, wie sie unter 3.3.2.4 beschrieben sind, am konfokalen Lasermikroskop (CLM) durchgeführt.

Als spezifische P-Glykoprotein Hemmstoffe wurden erneut Verapamil und PSC 833, sowie zusätzlich Cyclosporin A verwendet.

Cyclosporin A (CSA) ist ein lipophiles Undecapeptid mit einer stark immunsuppressiven Wirkung. An der Blut-Hirn Schranke zeigt es eine unerwartet niedrige Permeabilität, obwohl das Molekül sehr lipophil ist. Tsuji et al. (1993) und Sakata et al. (1994) konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachweisen, daß der Grund hierfür in der Tatsache liegt, daß CSA ein Substrat von P-Glykoprotein ist. Und das, obwohl es im Gegensatz zu den meisten der P-Glykoprotein Substrate weder ein organisches Kation, noch eine schwache organische Base darstellt (Schramm et al., 1995). Gleiche Ergebnisse finden sich auch bei Jetté et al. (1995b) und Wang et al. (1995).

In P-Glykoprotein überexprimierenden Zellen kann Cyclosporin A eine *multidrug-resistance* (MDR) positiv beeinflussen, indem es einen durch P-Glykoprotein verursachten Efflux z.B. eines Krebs-Medikamentes inhibiert. Es zählt daher ebenso wie sein Analogon PSC 833 zu den *reversal agents* von P-Glykoprotein verursachter MDR (Boesch et al., 1991; Twentyman, 1992; Cole et al., 1994; Slater et al., 1986).

Durch Untersuchungen an isolierten proximalen Nierentubuli von Killi-Fischen konnten Schramm et al. 1995 zeigen, daß ein fluoreszierendes Derivat des lipophilen CSA (NBDL-CSA) über die basolaterale Membran in die polarisierten Zellen diffundiert und von dort aus aktiv durch P-Glykoprotein über die luminalen Membran der Endothelzellen sekretiert wird.

Cyclosporin A eignet sich demnach neben PSC 833, Loperamid und Verapamil sehr gut für den Einsatz als Inhibitor bei der Untersuchung von Transportprozessen in isolierten Kapillaren, bei denen es um eine mögliche Beteiligung von P-Glykoprotein geht. Zudem konnte von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt werden, daß CSA ein sehr potenter Inhibitor von P-Glykoprotein ist, Mrp1 und Mrp2 vermittelte Transportprozesse jedoch gar nicht oder nur in sehr geringem Maße beeinflußt (Keppler et al., 1998; Leier et al., 1994; Barrand et al. 1993; Cole et al., 1994).

Wenn die frisch isolierten Gehirn-Kapillaren mit einer 1 μ M Lösung von Bodipy-Ivermectin, einem fluoreszierenden Derivat des Ivermectins, inkubiert werden, kann man bereits nach kurzer Zeit eine leichte Fluoreszenz in den Endothelzellen erkennen. Nach 5-10 Minuten beginnt die Sekretion von Bodipy-Ivermectin über die luminale Membran und die Anreicherung des fluoreszierenden Substrates im Lumen erreicht nach ca. 25-30 Minuten einen *steady state*.

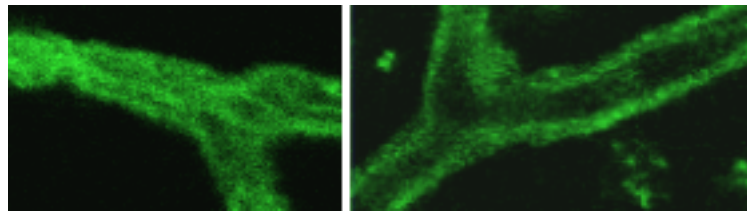


Abbildung 24: Inkubation der frisch isolierten Kapillaren mit 1 μ M Bodipy-Ivermectin sowie Einfluß des metabolischen Inhibitors NaCN (1 mM)

Die Fluoreszenz-Intensität im Lumen der Kapillaren ist 1,3-1,6 fach höher als in den Endothelzellen. Bodipy-Ivermectin wird also auch entgegen einem Konzentrationsgefälle aktiv in das Lumen der Kapillaren sekretiert. Dies zeigt sich auch daran, daß nach Vorinkubation der Kapillaren mit NaCN (20 min; 1 mM), eine Substanz die aktive Transportprozesse zum Erliegen bringt, die luminale Fluoreszenz deutlich vermindert ist. Auf die Fluoreszenz-Intensität in den Endothelzellen zeigt NaCN hingegen keinen Effekt. Die Aufnahme von Bodipy-Ivermectin aus dem umgebenden Medium in die Endothelzellen ist demnach kein aktiver Prozeß, sondern erfolgt über passive Mechanismen z.B. Diffusion.

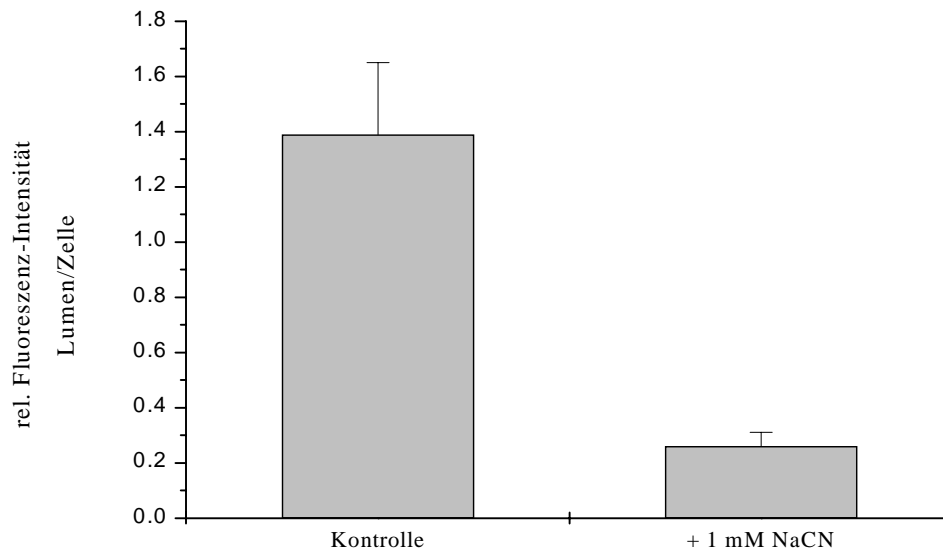


Abbildung 25: Relatives Fluoreszenz-Intensitäts-Verhältnis nach Inkubation der frisch isolierten Kapillaren mit 1 μM Bodipy-Ivermectin sowie Einfluß des metabolischen Inhibitors NaCN (1 mM)

In der obigen Abbildung sind exemplarisch die Ergebnisse einer Versuchsreihe graphisch wiedergegeben. Die Einzelwerte sowie die Ergebnisse der übrigen Versuchsreihen sind im Anhang tabellarisch aufgeführt.

Vorinkubation der isolierten Kapillaren mit steigenden Konzentrationen an unmarkiertem Ivermectin (5 μM , 10 μM und 50 μM) verursacht eine konzentrationsabhängige Abnahme der luminalen Fluoreszenz-Intensitäten. Dies ist beispielhaft in nachfolgender Abbildung dargestellt, die Einzelergebnisse befinden sich tabellarisch im Anhang.

Anhand der Graphik läßt sich ein IC_{50} -Wert – also diejenige Konzentration, bei der eine halbmaximale Hemmung auftritt – von ca. 6 μM Ivermectin abschätzen.

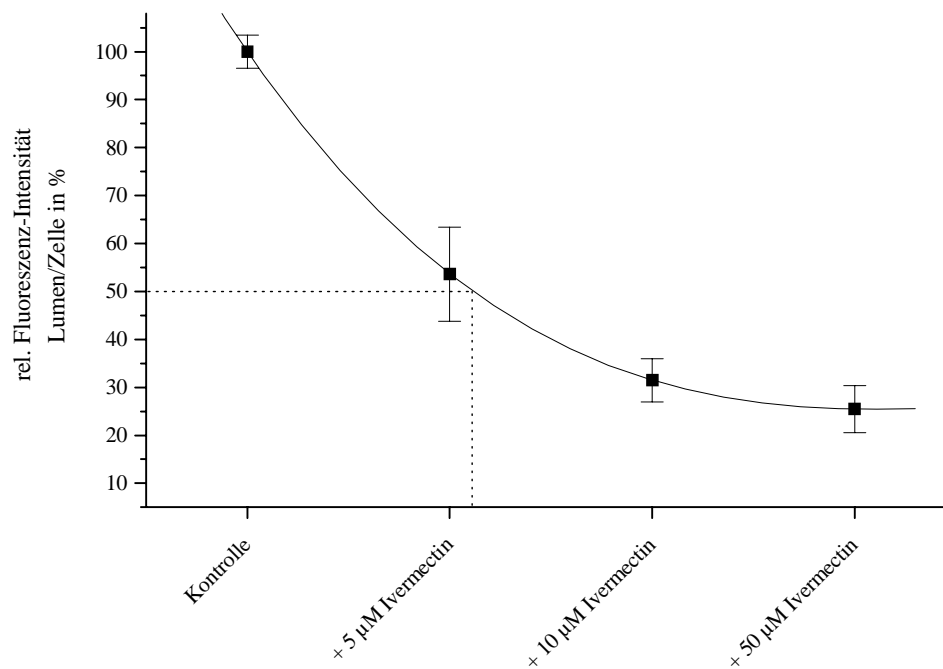


Abbildung 26: Relatives Fluoreszenz-Intensitäts-Verhältnis in % nach Inkubation der frisch isolierten Kapillaren mit 1 µM Bodipy-Ivermectin sowie Einfluß steigender Konzentrationen an unmarkiertem Ivermectin

Die Versuche zeigen zudem, daß der Transport von Bodipy-Ivermectin über die luminalen Membran isolierter Gehirn-Kapillaren spezifisch ist und über den selben Weg wie der des unmarkierten Ivermectins erfolgt.

Da ZNS-Nebenwirkungen vor allem in Gegenwart von P-Glykoprotein Inhibitoren oder in P-Glykoprotein *knock out* Mäusen auftraten, wurde der Effekt von P-Glykoprotein Inhibitoren bzw. Substraten auf den Transport von Bodipy-Ivermectin untersucht.

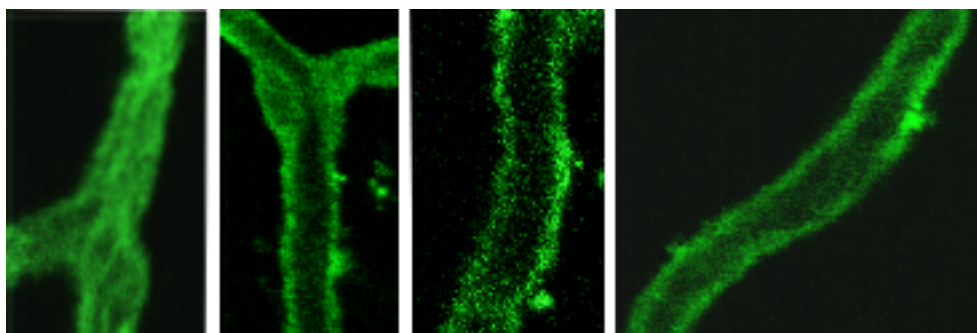


Abbildung 27: Inkubation der frisch isolierten Kapillaren mit 1 µM Bodipy-Ivermectin sowie Einfluß der P-Glykoprotein Inhibitoren bzw. Substrate Verapamil (50 µM), Cyclosporin A (10 µM) und PSC 833 (10 µM)

Die Sekretion von Bodipy-Ivermectin ins Lumen der Kapillaren ist sowohl bei einer Vorinkubation mit Verapamil (50 μ M, 20 min), als auch mit Cyclosporin A und PSC 833 (jeweils 10 μ M, 20 min) deutlich verringert. Man erhält ein sichtlich vermindertes relatives Fluoreszenz-Intensitäts-Verhältnis, wenn die Kapillaren zuvor mit den für P-Glykoprotein spezifischen Substanzen versetzt wurden.

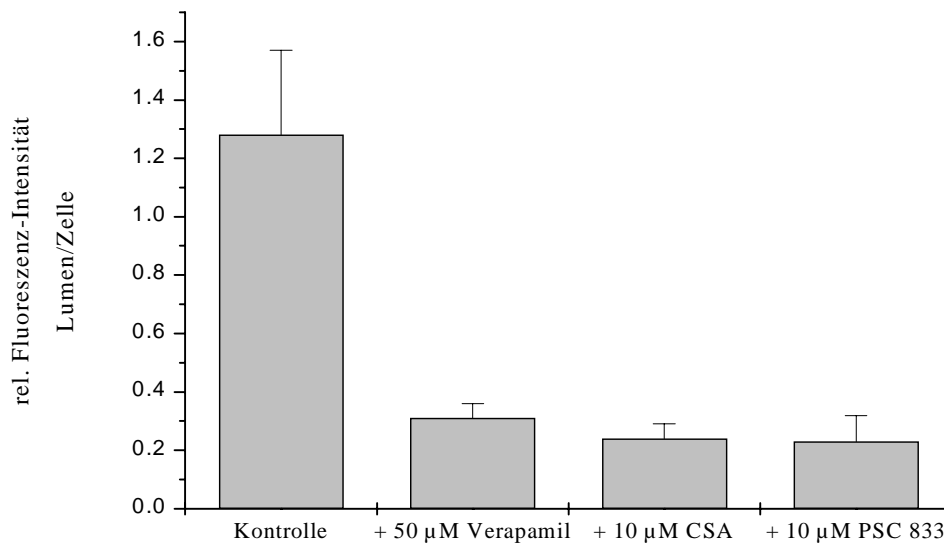


Abbildung 28: Relatives Fluoreszenz-Intensitäts-Verhältnis nach Inkubation der frisch isolierten Kapillaren mit 1 μ M Bodipy-Ivermectin sowie Einfluß der P-Glykoprotein Inhibitoren Verapamil (50 μ M), Cyclosporin A (10 μ M) und PSC 833 (10 μ M)

Die Ergebnisse der bisherigen Versuche lassen darauf schließen, daß Bodipy-Ivermectin mittels P-Glykoprotein aktiv über die luminal Membran der Gehirn-Kapillaren sekretiert wird. Als Kontrollversuch wurde daher im Gegenzug der Einfluß von unmarkiertem Ivermectin auf die Sekretion von Bodipy-Verapamil – ebenfalls eine fluoreszierende Substanz, die von P-Glykoprotein aktiv an der luminalen Membran ins Lumen isolierter Kapillaren sekretiert wird – untersucht.

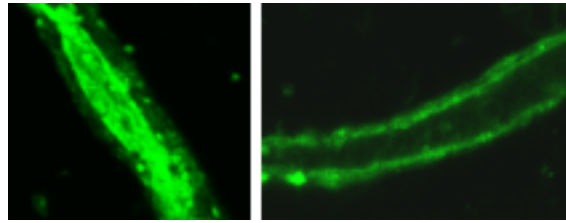


Abbildung 29: Inkubation der frisch isolierten Kapillaren mit dem P-Glykoprotein Substrat Bodipy-Verapamil (1 μM) in Abwesenheit und Gegenwart von Ivermectin (10 μM)

Auch hier ist eine deutlich verminderte luminal Sekretion des fluoreszierenden P-Glykoprotein Substrates zu erkennen; vergleichbar derjenigen, die sich nach Vorbehandlung der Kapillaren mit dem P-Glykoprotein Substrat Loperamid ergab.

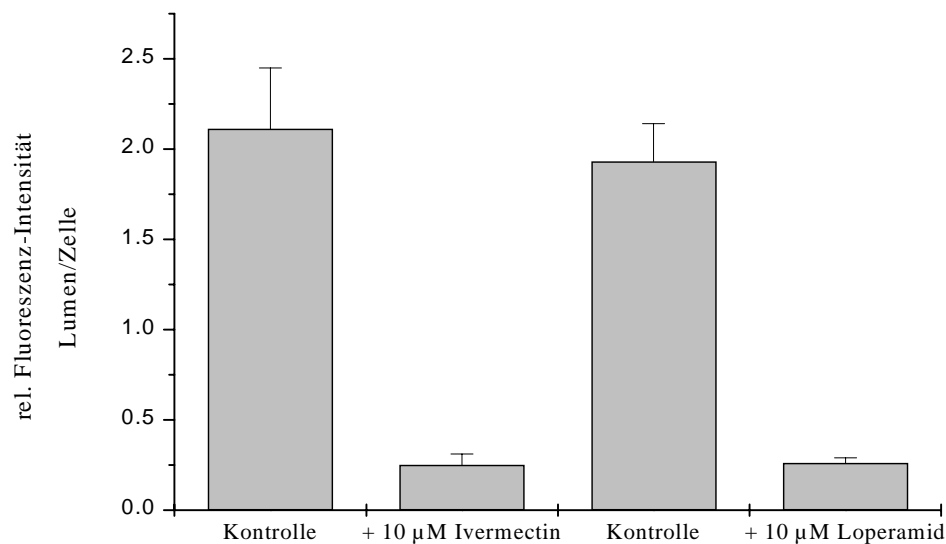


Abbildung 30: Relatives Fluoreszenz-Intensitäts-Verhältnis nach Inkubation der frisch isolierten Kapillaren mit dem P-Glykoprotein Substrat Bodipy-Verapamil (1 μM) in An- und Abwesenheit von Ivermectin (10 μM) sowie dem spezifischen P-Glykoprotein Substrat Loperamid (10 μM)

Um auszuschließen, daß Bodipy-Ivermectin neben P-Glykoprotein auch über andere ABC-Transportproteine an der Blut-Hirn Schranke sekretiert wird, wurde der Effekt von LTC₄, einem spezifischen Substrat der MRP Transporter, auf die Sekretion von Bodipy-Ivermectin getestet. Im Gegenzug wurde zudem die Auswirkung von unmarkiertem Ivermectin auf die Sekretion des fluoreszierenden Mrp2 Substrates Fluoreszein-Methotrexat (Fl-Mtx) untersucht.

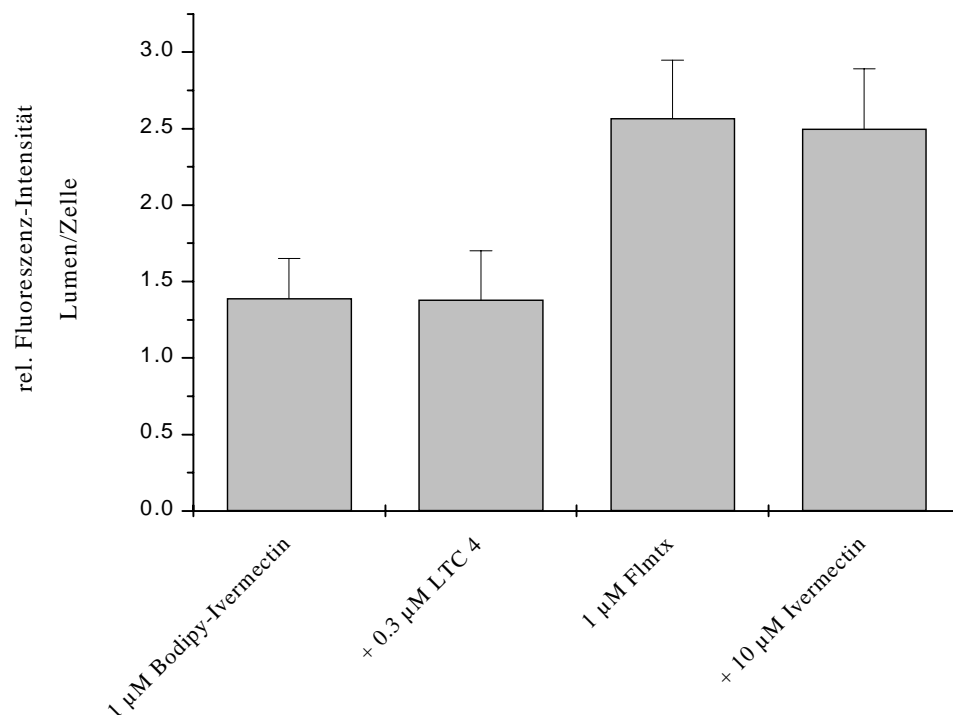


Abbildung 31: Relatives Fluoreszenz-Intensitäts-Verhältnis in den frisch isolierten Kapillaren nach Inkubation mit Bodipy-Ivermectin (1 µM) und Einfluß von LTC₄ (0.3 µM); sowie nach Inkubation mit Fl-Mtx (1 µM) in An- und Abwesenheit von Ivermectin (10 µM)

In beiden Fällen konnte keinerlei Effekt festgestellt werden. Es war weder ein Einfluß des Mrp2 Substrates LTC₄ auf die Sekretion von Bodipy-Ivermectin zu erkennen, noch beeinflusste unmarkiertes Ivermectin den Transport des Mrp2 Substrates Fl-Mtx. Eine Beteiligung von Mrp2 an den Transportprozessen von Ivermectin an der Blut-Hirn Schranke kann daher ausgeschlossen werden.

3.4.3 Schlußfolgerung

Die Ergebnisse der Experimente zeigen, daß ein fluoreszenz-markiertes Derivat von Ivermectin, Bodipy-Ivermectin, aus dem Inkubationsmedium in das Lumen frisch isolierter und funktionell intakter Kapillaren transportiert wird. Da der erste Schritt, die Aufnahme aus dem umgebenden Medium in die Endothelzellen, durch Gabe von NaCN nicht beeinflusst wird, handelt es sich bei diesem Schritt um einen Energie-unabhängigen Vorgang, wahrscheinlich einer Diffusion. Anschließend jedoch wird Bodipy-Ivermectin Energie-abhängig, carrier-vermittelt und spezifisch über die luminale Membran der Endothelzellen sekretiert. Dieser Schritt ist durch spezifische Substrate bzw. Hemmstoffe von P-Glyko-

protein, nicht aber durch das MRP Substrat LTC₄ beeinflussbar. Im Gegenzug zeigt auch Ivermectin keinen Einfluß auf den Mrp2-vermittelten Transport von Fl-Mtx.

Die Sekretion von Bodipy-Ivermectin an der Blut-Hirn Schranke ist demnach P-Glykoprotein spezifisch.

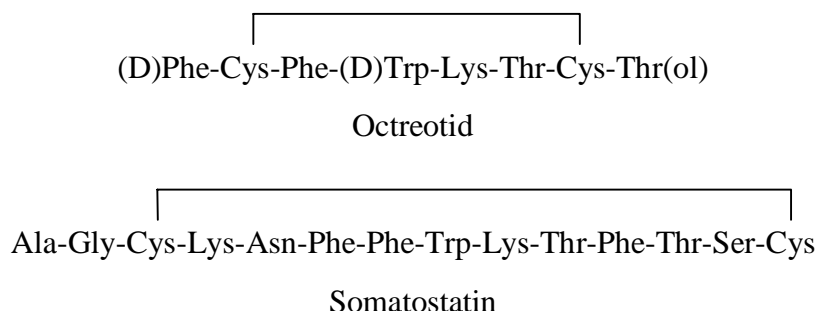
Dies konnte anhand der frisch isolierten Kapillaren erstmalig *in vitro* an einem intakten Gefäßverband gezeigt werden. Denn im Unterschied zu anderen *in vitro*-Modellen der Blut-Hirn Schranke, bei denen der intakte Gewebeverband der Endothelzellen bei der Isolierung zerstört wird und anschließend die Endothelzellen in Kultur wieder zu einem Monolayer herangezüchtet werden, bleibt bei der Isolierung der Kapillaren der intakte Gefäßverband erhalten.

3.5 Einfluss von P-Glykoprotein und/oder Mrp2 auf den Transport von Octreotid an der Blut-Hirn Schranke

Neben dem Anthelmintikum Ivermectin wurde auch der Arzneistoff Octreotid auf seine Transport-Charakteristika an der Blut-Hirn Schranke, sowie eventuelle Einflüsse von P-Glykoprotein und Mrp2 hin untersucht.

3.5.1 Grundlegendes zu Octreotid

Octreotid (SMS 201-995) ist ein synthetisches Analogon des natürlichen Peptides Somatostatin, mit qualitativ gleichartigen pharmakologischen Wirkungen, jedoch einer wesentlich längeren Halbwertszeit.



Somatostatin selber wird vor allem in Neuronen des ZNS, im endokrinen Pankreas und im Gastrointestinaltrakt (GIT) produziert. Sowohl die Somatostatin produzierenden Zellen als auch die Rezeptoren sind mit Ausnahme des Kleinhirns weiträumig im Gehirn verteilt (Eppelbaum, 1992; Finley et al., 1981; Johansson et al., 1984; Reubi et al., 1990). So finden sich z.B. in der Ratte ca. 25 % des gesamten Körper-Somatostatins im Gehirn (Patel, 1981).

Somatostatin hemmt in der Hypophyse die Freisetzung des Wachstumshormons (GH) und reguliert die Sekretion von TSH (thyreoidstimulierendes Hormon). Im GIT inhibiert Somatostatin die Freisetzung einer Vielzahl von Hormonen und zeigt einen generell inhibierenden Effekt auf die exokrine Sekretion im Darm z.B. von Gastrin, Pepsin und Galle. Darüber hinaus hemmt es die Glukose-stimulierte Ausschüttung von Insulin (Patel, 1992; Reichlin, 1983).

Neben seiner physiologisch regulativen Rolle scheint es jedoch auch bei der Pathophysiologie einer Reihe von Krankheiten, insbesondere der Alzheimer'schen und Parkinson'schen Demenz, Depressionen, Epilepsie und Diabetes mellitus, eine wichtige Rolle zu spielen. Die Möglichkeit, daß Veränderungen des Somatostatin Spiegels eventuell zur Pathophysiologie von Krankheiten des ZNS beitragen, wurde bereits Ende der Siebziger diskutiert (Patel et al., 1977). Anschließend mehrten sich die Berichte, daß die Somatostatin-Konzentrationen im Gehirn bzw. in der Cerebrospinal-Flüssigkeit (CSF) von Patienten mit schweren neuropsychiatrischen Krankheiten – insbesondere bei Alzheimer, Parkinson und Depressionen – stark vermindert sind (Davies et al., 1980; Beal, 1990).

Daß veränderte Spiegel oder Veränderungen in Vorstufen des Somatostatins gerade bei der Alzheimer'schen Krankheit eine klinische Relevanz haben, wird durch mehrere Beobachtungen gestützt (Rubinow et al. 1992): Es gibt unter anderem Berichte über eine Korrelation zwischen dem Grad der kognitiven Beeinträchtigung und der Reduktion der Somatostatin Levels im Gehirn, zum anderen wurde eine Korrelation zwischen der Abnahme von Somatostatin und der Schwere der Krankheit beobachtet. Ein weiterer Punkt war, daß man eine Erhöhung der Somatostatin Konzentration im CSF in Verbindung mit einem Rückgang der Demenz-Symptome bei Alzheimer-Patienten beobachten konnte, wenn diese einer Streßsituation ausgesetzt wurden. Verminderte Spiegel an Somatostatin wurden aber nicht nur im Gehirn besonders der jungen Alzheimer-Patienten gefunden, sondern auch bei Parkinson- und depressiven Patienten waren die Konzentrationen an Somatostatin im Gehirn deutlich vermindert. Gerade im Hinblick darauf könnte der Einsatz von Somatostatin Analoga möglicherweise einen großen therapeutischen Nutzen zeigen.

Die therapeutische Anwendung von Somatostatin selber ist aufgrund der sehr kurzen Halbwertszeit von 1-3 Minuten begrenzt. Gezielt wurden daher Analoga synthetisiert, die eine länger Halbwertszeit sowie eine größere Wirksamkeit aufwiesen. Eines dieser Produkte ist Octreotid, ein zyklisches Octapeptid, daß eine deutlich längere Plasma-Halbwertszeit von etwa 90 Minuten zeigt und ca. 45 mal potenter als sein natürliches Vorbild ist (Maton und Arakaki, 1992). Qualitativ hat Octreotid gleichartige pharmakologische Wirkungen, es hemmt die Sekretion von Peptidhormonen des gastroenteropankreatischen, endokrinen Systems und die Sekretion des Wachstumshormons. Es wird daher bei Akromegalie und hormonbildenden

Tumoren des Magendarm Traktes – z.B. metastasierenden Karzinoiden, VIPomen und Glukagonomen – eingesetzt.

Octreotid hat jedoch eine sehr geringe orale Bioverfügbarkeit von lediglich ca. 0,3% (Fuessl et al., 1987; Köhler et al., 1987; Fricker et al., 1992) und eine relativ hohe hepatische Elimination (Fricker, et al. 1994; Harris, 1994). Für eine mögliche therapeutische Anwendung im zentralen Nervensystem (ZNS), beispielsweise bei der Behandlung von Gehirntumoren, sowie der Alzheimer'schen und/oder Parkinson'schen Krankheit, stellt die eingeschränkte Blut-Hirn Schranken-Gängigkeit zusätzlich ein großes Problem dar:

Yamada et al. (1997) bestimmten nach einer i.v. Bolusinjektion die Gewebeverteilung von Octreotid in Ratten. Sie fanden Octreotid vor allem in der Leber und der Niere wieder, jedoch kaum im Gehirn.

Banks injizierte Mäusen Octapeptid-Analoga des Somatostatins und vermutete, daß ein bis dato unbekanntes (Transport) System für die generell geringe Gehirn-Permeabilität der untersuchten Analoga verantwortlich sei (Banks et al., 1990). Dem widersprechen Untersuchungen von Jaehde et al. (1994) an Monolayern von Gehirn-Endothelzellen. Sie kamen zu dem Ergebnis, daß Octreotid den Monolayer primär parazellulär und nicht über transzelluläre Diffusion oder über carrier-vermittelten Transport passiert. Sie wiesen jedoch ausdrücklich darauf hin, daß sie in ihrem *in vitro*-Modell wesentlich geringere TEER Werte messen konnten, als es für *in vivo* berichtet wird. Die Messung des transendothelialen, elektrischen Widerstandes (TEER) gilt als Maß für die Dichtigkeit der *tight junctions* des herangezuchteten Monolayers. Die Dichtigkeit der *tight junctions* in dem hier verwendeten Zellkultur-Modell ist demnach nicht mit der unter *in vivo*-Bedingungen vergleichbar, was wiederum nach eigenen Angaben zu einer Überbewertung der parazellulären Permeabilität *in vivo* führt (Jaehde et al., 1994).

Gerade weil sich die Angaben in der Literatur z.T. widersprechen, ist es wichtig, festzustellen welche(r) Transporter bzw. welche Umstände dafür verantwortlich sind, daß Octreotid nur in solch geringen Mengen die Blut-Hirn Schranke überwinden kann.

Das hier verwendete *in vitro*-Modell, die isolierten Kapillaren mit ihrem intakten Gewebeverband, stellt somit ein geeignetes Modell gerade bezüglich dieser Fragestellung dar.

Versuche an isolierten Hepatozyten zeigten, daß die hepatische Aufnahme kleiner Peptide – z.B. des Octreotids – einerseits carrier-vermittelt und zudem durch Beigabe von Gallensäuren gehemmt werden kann (Fricker et al., 1994; Terasaki et al., 1995). Aus Versuchen an EHBR Ratten – das sind Mrp2/cMOAT defiziente Ratten (vgl. 3.3.3.2) – zogen Yamada et al. (1996) den Schluß, daß für die Gallensekretion von Octreotid zwar ein Transporter – aber vermutlich nicht Mrp2 – sondern ein anderer (P-Glykoprotein?) zuständig sei. Untersuchungen an Vesikeln aus Gallenkanal-Membranen erhärteten zwar den Verdacht, daß Octreotid über P-Glykoprotein sekretiert wird, da durch Verapamil und PSC 833 eine Hemmung beobachtet

werden konnte. Allerdings blieb es bei einer Vermutung, da Versuche an *mdr1a knock out* Mäusen kaum einen Unterschied bezüglich der Gallensekretion von Octreotid gegenüber normalen Mäusen ergaben (Yamada et al., 1998). Dies könnte jedoch auch daran gelegen haben, daß Octreotid durch das in *mdr1a knock out* Mäusen vermehrt exprimierte *mdr1b*-Genprodukt sekretiert wurde.

In isolierten Nierentubuli von Killifischen konnten Gutmann et al. (2000) schließlich zeigen, daß Octreotid über P-Glykoprotein und Mrp2 sekretiert wird.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden, ob die ABC-Transporter P-Glykoprotein und/oder Mrp2 einen Einfluß auf den Transport von Octreotid an der Blut-Hirn Schranke haben und somit dazu beitragen, daß Octreotid nur in sehr geringem Maß ins Gehirn eindringen kann. Dadurch könnten sich Möglichkeiten ergeben, Octreotid gezielt – z.B. durch Co-Medikation spezifischer Hemmstoffe der Transporter – gehirngängiger zu machen. Octreotid könnte damit möglicherweise therapeutisch für die Behandlung einzelner, Wachstumshormon- oder TSH-abhängiger Tumore im Gehirn oder zur Behandlung anderer ZNS Krankheiten (z.B. Alzheimer'sche oder Parkinsonsche Demenz) eingesetzt werden.

3.5.2 Sekretionsversuche am CLM

Untersucht wurde der transendotheliale Transport eines fluoreszierenden Derivates des Octreotids (NBD-Octreotid). Um einen eventuellen Einfluß von P-Glykoprotein aufzuzeigen, wurden die frisch isolierten Kapillaren mit den spezifischen Substraten bzw. Hemmstoffen Loperamid, Verapamil, Cyclosporin A und PSC 833 vorinkubiert. Eine mögliche Beteiligung von MRP2 am Transport von Octreotid über die Blut-Hirn Schranke wurde durch Zugabe des spezifischen Substrates LTC₄ geprüft.

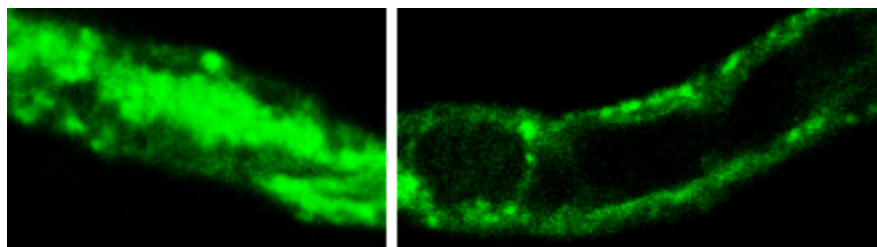


Abbildung 32: Inkubation der frisch isolierten Kapillaren mit 1 μ M NBD-Octreotid sowie Einfluß des metabolischen Inhibitors NaCN (1 mM)

Die obige Abbildung zeigt ein repräsentatives konfokales Bild eines isolierten Kapillarsegmentes nach einer 20 minütigen Inkubation mit 1 μ M NBD-Octreotid. Die Fluoreszenz-Intensität im Lumen der Kapillaren ist deutlich höher als in den Endothelzellen. Im Schnitt findet man bei den einzelnen Versuchsreihen eine 2 ½ - 3 ½ fach höhere Fluoreszenz-Intensität im Lumen als in den Endothelzellen. NBD-Octreotid reichert sich

demnach auch entgegen einem Konzentrationsgefälle im Lumen der Kapillaren an. Werden die Kapillaren zuvor für 20 min mit einer 1 mM Lösung von NaCN inkubiert, wird die luminale Anreicherung des fluoreszierenden Octreotids deutlich geblockt.

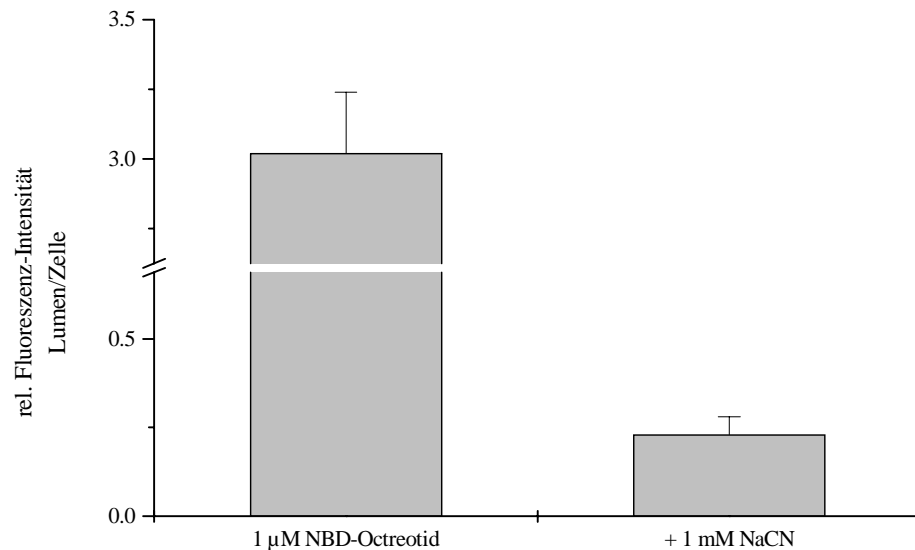


Abbildung 33: Relatives Fluoreszenz-Intensitäts-Verhältnis nach Inkubation der frisch isolierten Kapillaren mit 1 µM NBD-Octreotid sowie Einfluß des metabolischen Inhibitors NaCN (1 mM)

In obiger Abbildung – sowie den folgenden – sind graphisch die relativen Fluoreszenz-Intensitätsverhältnisse beispielhaft anhand der Ergebnisse einer Versuchsreihe dargestellt. Die Einzelwerte sowie die Ergebnisse der übrigen Versuchsreihen sind im Anhang tabellarisch aufgeführt.

Das relative Verhältnis der Fluoreszenz-Intensitäten zwischen Lumen und Zellen sinkt nach Vorinkubation mit NaCN deutlich unter 1 (= Hemmung der Sekretion ins Lumen). Die Fluoreszenz-Intensität in den Endothelzellen bleibt dagegen nahezu konstant. Die basolaterale Aufnahme von NBD-Octreotid aus dem umgebenden Medium in die Endothelzellen scheint demnach lediglich von passiven Mechanismen abzuhängen. Die Sekretion über die luminale Membran hingegen ist ein aktiver, Energie benötigender Prozeß.

In Gegenwart steigender Konzentrationen an nicht-markiertem Octreotid kann man eine konzentrationsabhängige Abnahme der luminalen Fluoreszenz-Intensitäten beobachten. Die zelluläre Fluoreszenz-Intensität wird auch hier kaum beeinflusst.

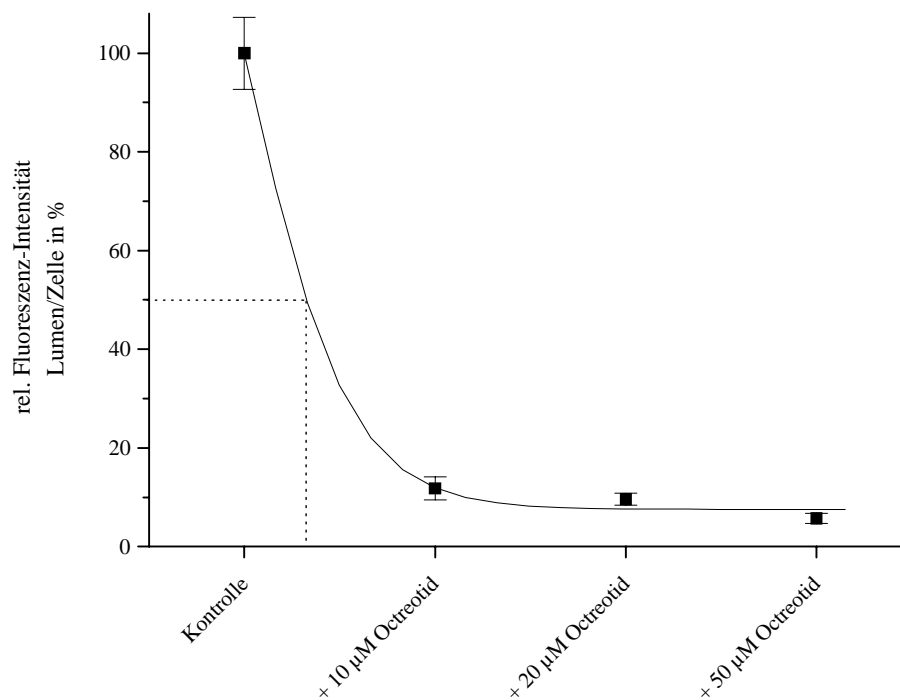


Abbildung 34: Relatives Fluoreszenz-Intensitäts-Verhältnis in % nach Inkubation der frisch isolierten Kapillaren mit 1 µM NBD-Octreotid sowie Einfluß steigender Konzentrationen an nicht-markiertem Octreotid

Dies zeigt zum einen, daß der Transport von NBD-Octreotid spezifisch, zum anderen über den selben Weg wie das nicht-markierte Octreotid erfolgt.

Anhand der Graphik läßt sich abschätzen, daß der IC_{50} -Wert – also diejenige Konzentration, bei der eine halbmaximale Hemmung auftritt – unter 10 µM Octreotid liegt.

Auch andere Somatostatin-Analoga, wie beispielsweise ein zuckergekoppeltes Octreotid-Analogon (SDZ 212-611, Albert et al., 1993) zeigen ähnliche Ergebnisse.

Zur Klärung der Fragestellung, ob der Transport von Octreotid an der Blut-Hirn Schranke durch P-Glykoprotein beeinflusst wird, wurden die frisch isolierten Kapillaren jeweils 20 min mit dem P-Glykoprotein Substraten bzw. spezifischen Inhibitoren Loperamid (10 µM), Verapamil (50 µM), Cyclosporin A (10 µM) und PSC 833 (10 µM) vorinkubiert.

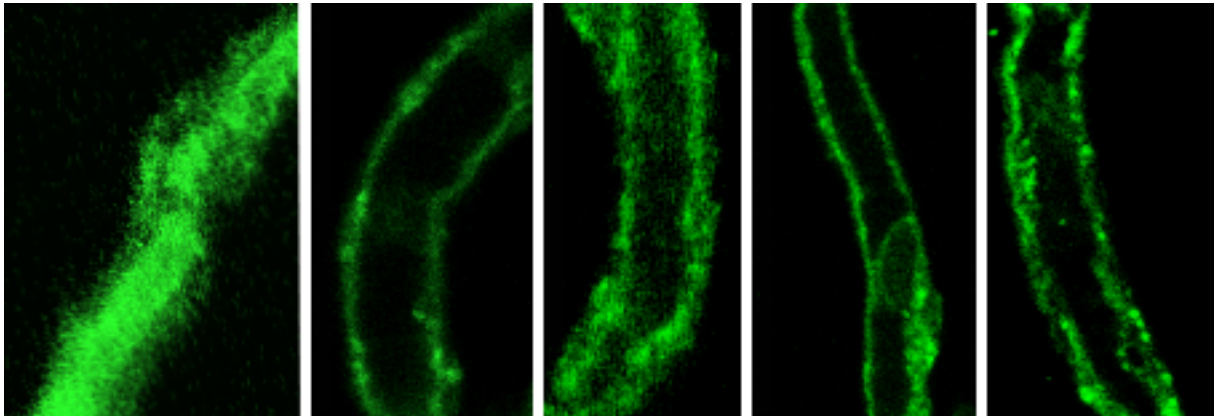


Abbildung 35: Inkubation der frisch isolierten Kapillaren mit 1 μM Bodipy-Ivermectin sowie Einfluß der P-Glykoprotein Inhibitoren bzw. Substrate Loperamid (10 μM), Verapamil (50 μM), Cyclosporin A (10 μM) und PSC 833 (10 μM)

Sowohl Loperamid, Verapamil, Cyclosporin A als auch PSC 833 reduzieren merklich den Transport aus den Endothelzellen ins Lumen und verhindern dadurch eine Anreicherung des fluoreszierenden Octreotids im Lumen der Kapillaren.

Bei jeder der Substanzen wird die deutliche Hemmung der Sekretion ins Lumen durch ein vermindertes Verhältnis der Fluoreszenz-Intensitäten in den Zellen und im Lumen sichtbar.

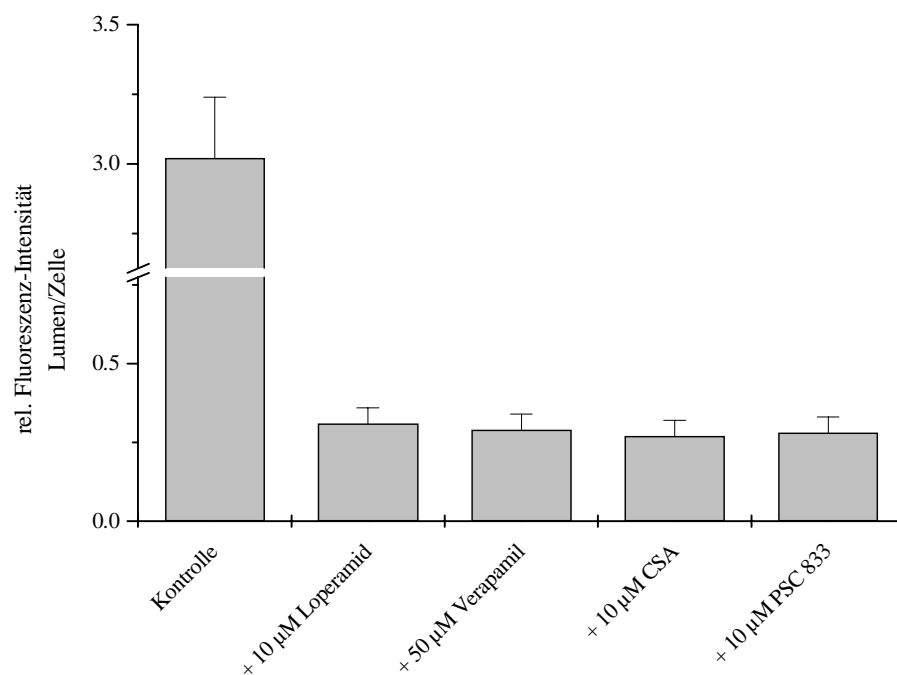


Abbildung 36: Relatives Fluoreszenz-Intensitäts-Verhältnis nach Inkubation der frisch isolierten Kapillaren mit 1 μM NBD-Octreotid sowie Einfluß der

P-Glykoprotein Inhibitoren bzw. Substrate Loperamid (10 μM), Verapamil (50 μM), Cyclosporin A (10 μM) und PSC 833 (10 μM)

Die Versuchsergebnisse zeigen, daß P-Glykoprotein am Transportprozeß von NBD-Octreotid aus den Endothelzellen ins Lumen der Kapillaren beteiligt ist: Einerseits wird die Sekretion von NBD-Octreotid durch P-Glykoprotein Substrate bzw. Hemmstoffe beeinflusst, andererseits wird zudem auch die P-Glykoprotein vermittelte Sekretion von Bodipy-Verapamil durch nicht-markiertes Octreotid deutlich geblockt.

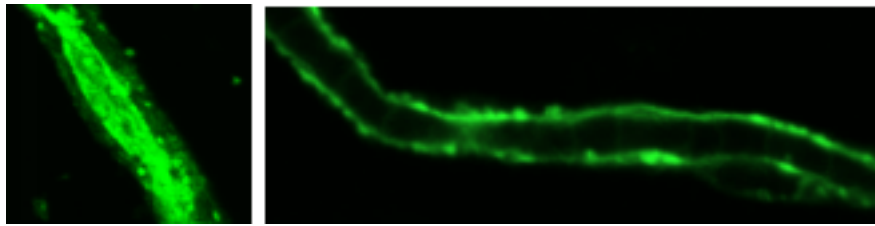


Abbildung 37: Inkubation der frisch isolierten Kapillaren mit dem P-Glykoprotein Substrat Bodipy-Verapamil (1 μM) in Gegenwart und Abwesenheit von Octreotid (10 μM)

Um eine eventuelle Beteiligung von Mrp2 an dem Transport von Octreotid an der Blut-Hirn Schranke zu ermitteln, wurde zum einen die Auswirkung einer Vorinkubation mit dem Mrp2 Substrat LTC₄ auf die Sekretion von NBD-Octreotid getestet. Zum andern wurde der Effekt von nicht-markiertem Octreotid auf den Mrp2 vermittelten Transport von Fl-Mtx untersucht.

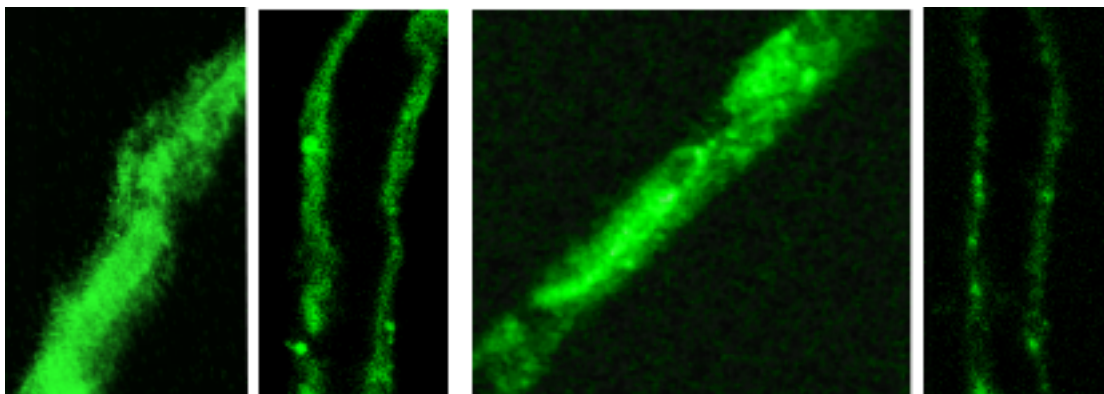


Abbildung 38: Inkubation der frisch isolierten Kapillaren mit NBD-Octreotid (1 μM) und mit und ohne LTC₄ (0.3 μM), sowie Einfluß von Octreotid (10 μM) auf die Sekretion von Fl-Mtx (1 μM)

Anhand der Bilder vom konfokalen Laser Mikroskop kann man erkennen, daß einerseits die Sekretion von NBD-Octreotid ins Kapillar-Lumen durch LTC₄ deutlich vermindert ist,

andererseits aber auch die Sekretion von Fl-Mtx durch Vorinkubation mit Octreotid deutlich beeinflußt wird.

Das relative Fluoreszenz-Intensitäts-Verhältnis sinkt daher in beiden Fällen deutlich auf unter 1 ab.

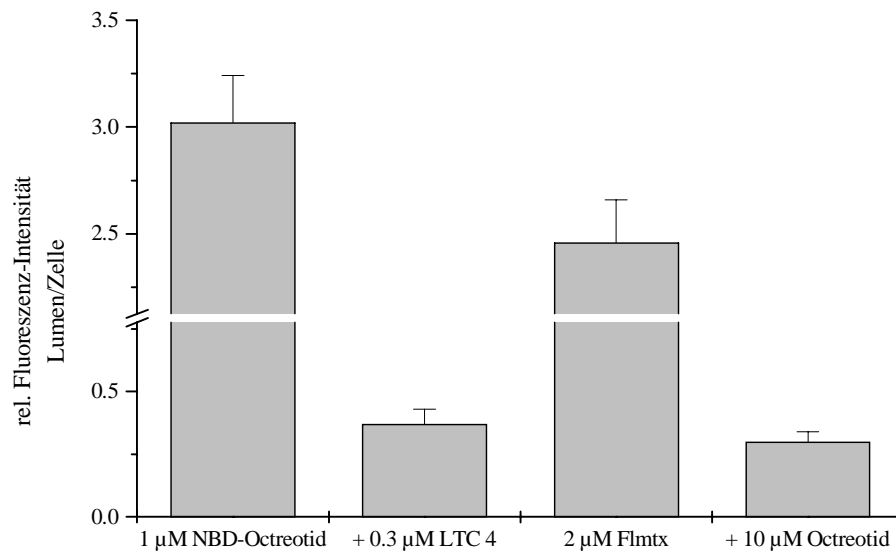


Abbildung 39: Relatives Fluoreszenz-Intensitäts-Verhältnis in den frisch isolierten Kapillaren nach Inkubation mit NBD-Octreotid (1 µM) und Einfluß von LTC₄ (0.3 µM); sowie nach Inkubation mit Fl-Mtx (1 µM) in An- und Abwesenheit von Octreotid (10 µM)

Sowohl die Ergebnisse der Versuche mit NBD-Octreotid und LTC₄, als auch diejenigen mit Fl-Mtx und nicht-markiertem Octreotid, lassen vermuten, daß auch Mrp2 am Transport von Octreotid an der Blut-Hirn Schranke beteiligt ist.

3.5.3 Schlußfolgerung

Der Transport von NBD-Octreotid, einem fluoreszenz-markiertem Derivat von Octreotid, in das Lumen von frisch isolierten Gehirn-Kapillaren zeigt alle Merkmale eines aktiven, carrier-vermittelten Prozesses: Die fluoreszierende Substanz reichert sich entgegen einem Konzentrationsgefälle im Lumen an. Diese Anreicherung wird durch Zugabe von NaCN, das in den Energiestoffwechsel der Zelle eingreift, geblockt. Zudem wird die Anreicherung im Lumen konzentrationsabhängig von Octreotid selbst sowie von Substanzen, die P-Glykoprotein- und Mrp2 vermittelte Transportprozesse kompetitiv hemmen, vermindert. Dies konnte für Loperamid, Verapamil, Cyclosporin A, PSC 833 und LTC₄ nachgewiesen werden.

Auch die Ergebnisse derjenigen Versuche, bei denen sowohl die P-Glykoprotein vermittelte Sekretion von Bodipy-Verapamil als auch der Transport des Mrp2 Substrates Fl-Mtx durch nicht-markiertes Octreotid deutlich beeinflusst wird, weisen auf eine Interaktion von Octreotid sowohl mit P-Glykoprotein als auch Mrp2 an der Blut-Hirn Schranke hin.

Dies steht im Einklang mit Versuchen von Gutmann et al., die an isolierten Nierentubuli von Killifischen nachweisen konnten, daß Substanzen wie beispielsweise HIV-Protease Inhibitoren, die wie Octreotid eine peptidähnliche Struktur aufweisen, von Mrp2 als Substrat erkannt werden (Gutmann et al., 1999). Zum anderen zeigten die Autoren, daß Octreotid über die luminale Membran der renalen proximalen Tubuli ebenfalls sowohl von P-Glykoprotein als auch Mrp2 sekretiert wird (Gutmann et al., 2000).

Anhand des hier verwendeten *in vitro*-Modells der Blut-Hirn Schranke konnte gezeigt werden, daß Octreotid aktiv aus den Endothelzellen zurück ins Blut – vermittelt durch P-Glykoprotein und Mrp2 – sekretiert wird. Dies wäre eine plausible Erklärung dafür, daß Octreotid in nur sehr geringem Maß ins Gehirn eindringen kann. Zum anderen ist dies ein möglicher Ansatzpunkt, um Octreotid gezielt – z.B. durch Co-Medikation spezifischer Hemmstoffe dieser Transportproteine – gehirngängiger zu machen. Octreotid stünde dann möglicherweise zur Behandlung von Gehirntumoren, die Wachstumshormon- oder Thyreotropin abhängig sind, oder zur Behandlung anderer ZNS Krankheiten (beispielsweise der Alzheimer'schen oder Parkinson'schen Demenz) zur Verfügung.

4 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Ziel dieser Arbeit war es ein verbessertes *in vitro*-Modell der Blut-Hirn Schranke zu erarbeiten, anhand dessen man insbesondere den Einfluß der ABC-Transporter-Proteine P-Glykoprotein und MRP auf den Transport von Arzneistoffen an der Blut-Hirn Schranke untersuchen kann. Es sollte untersucht werden, ob frisch isolierte Kapillaren aus dem Gehirn von Schweinen für diese Fragestellung geeignet sind, da bisher bekannte und verwendete Modelle wie z.B. isolierte Endothelzellen in Kultur diesbezüglich einige Nachteile besitzen. Um den *in vivo*-Bedingungen möglichst nahe zu kommen, sollten die Endothelzellen intakter Kapillaren – im Gegensatz zu Zellkultur-Modellen – direkt nach der Isolierung in ihrem Verhalten untersucht werden.

Es galt daher zunächst einmal morphologisch und funktionell intakte Gehirn-Kapillaren zu isolieren, die über den Untersuchungszeitraum hinweg vital sind und die typischen Eigenschaften der Blut-Hirn Schranke während der Isolierung nicht verloren haben. Im nächsten Schritt mußte der Nachweis erbracht werden, daß die Transporter-Proteine, deren Einfluß an der Blut-Hirn Schranke mit diesem Modell untersucht werden soll, in den isolierten Kapillaren exprimiert und funktionell aktiv sind.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

- In Anlehnung an Pardridge (1985) wurden die Kapillaren mechanisch aus dem Gehirn von Schweinen isoliert und anschließend morphologisch, enzymatisch und immunhistochemisch untersucht. Die Funktionsfähigkeit und Dichte der *tight junctions* als eines der wichtigsten Merkmale der Blut-Hirn Schranke blieb durch diese Isolierungsmethode erhalten. Die Kapillaren wiesen das endothelspezifische Protein „von Willebrand-Faktor“ auf und besaßen eine hohe Aktivität der Markerenzyme γ -Glutamyl-Transpeptidase und Alkalischen Phosphatase.
- Durch immunhistochemische Färbungen und Western Blot Experimente konnte belegt werden, daß sowohl P-Glykoprotein als auch Mrp2 in den frisch isolierten Kapillaren exprimiert werden.
- Sekretions-Untersuchungen an einem konfokalen Lasermikroskop mit spezifischen Substraten und Hemmstoffen zeigten, daß diese sekretorischen Transporter-Proteine in dem hier verwendeten *in vitro*-Modell der Blut-Hirn Schranke, den frisch isolierten Gehirn-Kapillaren, auch funktionell aktiv sind.

Damit stand ein in seiner Zell- und Gewebe-Funktionalität bewiesenes *in vitro*-Modell der Blut-Hirn Schranke zur Verfügung, mit dem man insbesondere den Einfluß dieser Proteine auf den Transport von Arzneistoffen an der Blut-Hirn Schranke untersuchen und dadurch z.B. eine mögliche Ursache für die geringe Gehirngängigkeit mancher Arzneistoffe aufdecken kann. Dies wiederum bedeutet die Möglichkeit eines Ansatzpunktes, um die betreffenden

Arzneistoffe gezielt – z.B. durch Co-Medikation spezifischer Hemmstoffe dieser Transporter – Gehirn-gängiger und damit eventuell für die Behandlung einiger Krankheiten (z.B. Gehirntumore, Alzheimer, Parkinson) im ZNS verfügbar zu machen.

Anhand des im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten und charakterisierten *in vitro*-Modells der Blut-Hirn Schranke – den mechanisch frisch isolierten Kapillaren – wurde abschließend der Transport der beiden Arzneistoffe Ivermectin und Octreotid an der Blut-Hirn Schranke auf eine mögliche Beteiligung der Transporter-Proteine P-Glykoprotein und Mrp2 hin untersucht.

- Für das Anthelmintikum Ivermectin konnte aufgrund der Sekretions-Untersuchungen gezeigt werden, daß P-Glykoprotein einen limitierenden Faktor bezüglich der Gehirn-gängigkeit an der Blut-Hirn Schranke darstellt.
- Für das Somatostatin-Analogon Octreotid ergaben die Untersuchungen, daß sowohl P-Glykoprotein als auch Mrp2 an dessen Transport an der Blut-Hirn Schranke beteiligt sind.

5 ANHANG

Tabelle 1:

Enzymaktivität (EA) der alkalischen Phosphatase

		EA [Sigma U/ mg Protein]	s	s_{rel} (%)	n	Anreicherung gegenüber Hirnhomogenat
V ₁	Gehirnhomogenat	2.04	0.09	4.65	2	
	Kapillaren	65.64	9.20	14.01	4	32.3 fach
V ₂	Gehirnhomogenat	1.88	0.01	0.60	2	
	Kapillaren	61.39	2.47	4.03	3	32.6 fach
V ₃	Gehirnhomogenat	1.78	0.02	1.30	2	
	Kapillaren	56.34	4.21	7.47	3	31.6 fach

Tabelle 2:

Enzymaktivität (EA) der γ -Glutamyl-Transpeptidase

		EA [U/ mg Protein]	s	s_{rel} (%)	n	Anreicherung gegenüber Hirnhomogenat
V ₁	Gehirnhomogenat	12.93	1.52	11.76	8	
	Kapillaren	201.00	5.90	2.94	9	15.5 fach
V ₂	Gehirnhomogenat	15.04	0.60	4.14	8	
	Kapillaren	366.91	26.3	7.16	10	24.4 fach
V ₃	Gehirnhomogenat	16.13	0.85	5.27	6	
	Kapillaren	235.60	8.72	3.70	8	14.6 fach
V ₄	Gehirnhomogenat	16.35	0.86	5.27	6	
	Kapillaren	295.39	27.1	9.17	10	18.1 fach

Tabelle 3:

Bodipy-Verapamil (1 μ M) vorinkubiert mit NaCN (1 mM) und Loperamid (10 μ M)

		rel. Fluores- zenzintens. Lumen/Zelle	s	S _{rel} (%)	n
V ₁	Kontrolle	2.06	0.16	7.76	10
	+ NaCN	0.27	0.03	10.39	10
V ₁	Kontrolle	1.93	0.21	11.10	10
	+ Loper.	0.32	0.05	14.90	10
V ₂	Kontrolle	1.93	0.21	11.10	10
	+ Loper.	0.26	0.03	10.69	10
V ₃	Kontrolle	2.06	0.16	7.76	10
	+ Loper.	0.32	0.05	15.58	10
V ₄	Kontrolle	2.06	0.16	7.76	10
	+ Loper.	0.32	0.04	12.39	10
V ₅	Kontrolle	2.06	0.16	7.76	10
	+ LTC ₄	2.11	0.16	7.59	10

Tabelle 5:

Fl-Mtx (1-2 μ M) vorinkubiert mit LTC₄ (0,3 μ M)

		rel. Fluores- zenzintens. Lumen/Zelle	s	S _{rel} (%)	n
V ₁	Kon. 2 μ M	3.10	0.75	24.19	12
	+ LTC ₄	0.31	0.08	24.05	9
V ₂	Kon. 2 μ M	3.30	0.35	10.56	12
	+ LTC ₄	0.30	0.07	22.67	10
V ₃	Kon. 1 μ M	2.43	0.54	22.18	12
	+ LTC ₄	0.23	0.07	30.11	10
V ₄	Kon. 1 μ M	2.69	0.40	14.89	12
	+ LTC ₄	0.24	0.05	19.07	10

Tabelle 4:

Fl-Mtx (1-2 μ M) vorinkubiert mit NaCN (1 mM)

		rel. Fluores- zenzintens. Lumen/Zelle	s	S _{rel} (%)	n
V ₁	Kon. 2 μ M	3.30	0.35	10.56	12
	+ NaCN	0.29	0.05	16.83	10
V ₂	Kon. 2 μ M	3.10	0.75	24.19	12
	+ NaCN	0.29	0.03	11.44	10
V ₃	Kon. 1 μ M	2.69	0.40	14.89	12
	+ NaCN	0.21	0.07	30.88	10
V ₄	Kon. 1 μ M	2.65	0.45	17.11	12
	+ NaCN	0.29	0.05	16.20	8

Tabelle 6:

Fl-Mtx (2 μ M) vorinkubiert mit Loperamid (10 μ M)

		rel. Fluores- zenzintens. Lumen/Zelle	s	S _{rel} (%)	n
V ₁	Kontrolle	2.46	0.20	8.01	10
	+ Loper.	2.20	0.29	13.27	10
V ₂	Kontrolle	2.46	0.20	8.01	10
	+ Loper.	2.31	0.28	12.09	10
V ₃	Kontrolle	2.17	0.20	9.36	10
	+ Loper.	2.46	0.17	6.95	10

Tabelle 7:

Fl-Mtx (1-2 μ M) vorinkubiert mit Verapamil (50 μ M)

		rel. Fluores- zenzintens. Lumen/Zelle	s	S _{rel} (%)	n
V ₁	Kon. 2 μ M	3.10	0.75	24.19	12
	+ Verap.	3.12	0.47	15.13	10
V ₂	Kon. 2 μ M	3.17	0.71	22.45	12
	+ Verap.	3.19	0.71	22.34	10
V ₃	Kon. 1 μ M	2.43	0.54	22.18	12
	+ Verap.	2.48	0.42	16.84	10
V ₄	Kon. 1 μ M	2.69	0.40	14.89	12
	+ Verap.	2.69	0.19	7.15	10

Tabelle 8

Fl-Mtx (1-2 μ M) vorinkubiert mit PSC 833 (10 μ M)

		rel. Fluores- zenzintens. Lumen/Zelle	s	S _{rel} (%)	n
V ₁	Kon. 2 μ M	3.10	0.75	24.19	12
	+ PSC	3.04	0.26	8.41	10
V ₂	Kon. 2 μ M	3.17	0.71	22.45	12
	+ PSC	3.06	0.50	16.30	10
V ₃	Kon. 1 μ M	2.69	0.40	14.89	12
	+ PSC	2.95	0.29	9.79	7
V ₄	Kon. 1 μ M	2.57	0.38	14.64	12
	+ PSC	2.56	0.46	17.92	8

Tabelle 9:

Bodipy-Ivermectin (1 μ M) vorinkubiert mit NaCN (1 mM)

		rel. Fluores- zenzintens. Lumen/Zelle	s	S _{rel} (%)	n
V ₁	Kontrolle	1.21	0.17	13.84	12
	+ NaCN	0.26	0.05	19.86	10
V ₂	Kontrolle	1.39	0.26	18.86	12
	+ NaCN	0.26	0.05	19.86	6
V ₃	Kontrolle	1.28	0.29	22.52	12
	+ NaCN	0.22	0.07	33.36	10

Tabelle 10:

Bodipy-Ivermectin (1 μ M) vorinkubiert mit Ivermectin (5 μ M)

		rel. Fluores- zenzintens. Lumen/Zelle	s	S _{rel} (%)	n
V ₁	Kontrolle	1.31	0.16	12.30	12
	+ Iverm.	0.71	0.13	18.20	6
V ₂	Kontrolle	1.36	0.18	13.44	12
	+ Iverm.	0.63	0.12	19.64	8
V ₃	Kontrolle	1.30	0.08	6.26	10
	+ Iverm.	0.60	0.15	24.69	7

Tabelle 11:

Bodipy-Ivermectin (1 μ M) vorinkubiert
mit Ivermectin (10 μ M)

		rel. Fluores- zenzintens. Lumen/Zelle	s	S_{rel} (%)	n
V ₁	Kontrolle	1.21	0.17	13.84	12
	+ Iverm.	0.38	0.03	7.11	6
V ₂	Kontrolle	1.39	0.26	18.86	12
	+ Iverm.	0.42	0.06	14.19	5
V ₃	Kontrolle	1.28	0.29	22.52	12
	+ Iverm.	0.50	0.09	17.04	7

Tabelle 12:

Bodipy-Ivermectin (1 μ M) vorinkubiert
mit Ivermectin (50 μ M)

		rel. Fluores- zenzintens. Lumen/Zelle	s	S_{rel} (%)	n
V ₁	Kontrolle	1.36	0.18	13.44	10
	+ Iverm.	0.33	0.07	21.34	4
V ₂	Kontrolle	1.30	0.08	6.26	12
	+ Iverm.	0.34	0.07	19.20	6

Tabelle 13:

Bodipy-Ivermectin (1 μ M) vorinkubiert
mit Verapamil (50 μ M)

		rel. Fluores- zenzintens. Lumen/Zelle	s	S_{rel} (%)	n
V ₁	Kontrolle	1.21	0.17	13.84	12
	+ Verap.	0.29	0.04	13.08	6
V ₂	Kontrolle	1.39	0.26	18.86	12
	+ Verap.	0.31	0.05	15.59	6
V ₃	Kontrolle	1.28	0.29	22.52	12
	+ Verap.	0.31	0.05	17.60	10

Tabelle 14:

Bodipy-Ivermectin (1 μ M) vorinkubiert
mit Cyclosporin A (10 μ M)

		rel. Fluores- zenzintens. Lumen/Zelle	s	S_{rel} (%)	n
V ₁	Kontrolle	1.21	0.17	13.84	12
	+ CSA	0.27	0.05	19.67	7
V ₂	Kontrolle	1.39	0.26	18.86	12
	+ CSA	0.24	0.07	27.27	6
V ₃	Kontrolle	1.28	0.29	22.52	12
	+ CSA	0.24	0.05	19.91	8

Tabelle 15:

Bodipy-Ivermectin (1 μ M) vorinkubiert
mit PSC 833 (10 μ M)

		rel. Fluores- zenzintens. Lumen/Zelle	s	S _{rel} (%)	n
V ₁	Kontrolle	1.21	0.17	13.84	12
	+ PSC	0.22	0.03	15.37	8
V ₂	Kontrolle	1.39	0.26	18.86	12
	+ PSC	0.26	0.06	23.36	6
V ₃	Kontrolle	1.28	0.29	22.52	12
	+ PSC	0.23	0.09	39.48	10

Tabelle 16:

Bodipy-Verapamil (1-2 μ M) vorinkubiert
mit Ivermectin (10 μ M)

		rel. Fluores- zenzintens. Lumen/Zelle	s	S _{rel} (%)	n
V ₁	Kon. 2 μ M	2.35	0.30	12.82	10
	+ Iverm.	0.24	0.06	22.95	8
V ₂	Kon. 1 μ M	2.37	0.39	16.47	10
	+ Iverm.	0.25	0.04	14.32	7
V ₃	Kon. 1 μ M	2.11	0.34	16.26	10
	+ Iverm.	0.25	0.06	23.61	8

Tabelle 17:

Bodipy-Ivermectin (1 μ M) vorinkubiert
mit LTC₄ (0,3 μ M)

		rel. Fluores- zenzintens. Lumen/Zelle	s	S _{rel} (%)	n
V ₁	Kontrolle	1.21	0.17	13.84	12
	+ LTC ₄	1.23	0.27	21.64	7
V ₂	Kontrolle	1.39	0.26	18.86	12
	+ LTC ₄	1.38	0.32	23.15	5
V ₃	Kontrolle	1.28	0.29	22.52	12
	+ LTC ₄	1.28	0.21	16.49	10

Tabelle 18:

Fl-Mtx (1 μ M) vorinkubiert mit Ivermectin
(10 μ M)

		rel. Fluores- zenzintens. Lumen/Zelle	s	S _{rel} (%)	n
V ₁	Kontrolle	2.57	0.38	14.64	12
	+ Iverm.	2.50	0.39	15.68	10
V ₂	Kontrolle	2.65	0.45	17.11	12
	+ Iverm.	2.69	0.49	18.21	10
V ₃	Kontrolle	2.38	0.38	15.98	12
	+ Iverm.	2.54	0.30	11.84	10

Tabelle 19:

NBD-Octreotid (1 μ M) vorinkubiert mit NaCN (1 mM)

		rel. Fluores- zenzintens. Lumen/Zelle	s	S _{rel} (%)	n
V ₁	Kontrolle	2.40	0.14	5.94	10
	+ NaCN	0.27	0.04	15.81	10
V ₂	Kontrolle	3.66	0.55	15.05	10
	+ NaCN	0.17	0.03	14.85	10
V ₃	Kontrolle	3.02	0.22	7.27	10
	+ NaCN	0.23	0.05	19.77	10
V ₄	Kontrolle	2.47	0.14	5.72	10
	+ NaCN	0.15	0.02	14.7	10

Tabelle 20:

NBD-Octreotid (1 μ M) vorinkubiert mit Octreotid (10 μ M)

		rel. Fluores- zenzintens. Lumen/Zelle	s	S _{rel} (%)	n
V ₁	Kontrolle	3.66	0.55	15.05	10
	+ Octr.	0.45	0.07	16.09	10
V ₂	Kontrolle	3.02	0.22	7.27	10
	+ Octr.	0.36	0.07	19.42	10
V ₃	Kontrolle	2.47	0.14	5.72	10
	+ Octr.	0.36	0.06	17.88	10

Tabelle 21:

NBD-Octreotid (1 μ M) vorinkubiert mit Octreotid (20 μ M)

		rel. Fluores- zenzintens. Lumen/Zelle	s	S _{rel} (%)	n
V ₁	Kontrolle	3.66	0.55	15.05	10
	+ Octr.	0.35	0.08	21.98	10
V ₂	Kontrolle	3.02	0.22	7.27	10
	+ Octr.	0.29	0.04	12.20	10
V ₃	Kontrolle	2.47	0.14	5.72	10
	+ Octr.	0.25	0.04	14.91	10

Tabelle 22:

NBD-Octreotid (1 μ M) vorinkubiert mit Octreotid (50 μ M)

		rel. Fluores- zenzintens. Lumen/Zelle	s	S _{rel} (%)	n
V ₁	Kontrolle	3.66	0.55	15.05	10
	+ Octr.	0.20	0.04	20.65	10
V ₂	Kontrolle	3.02	0.22	7.27	10
	+ Octr.	0.17	0.03	18.27	10
V ₃	Kontrolle	2.47	0.14	5.72	10
	+ Octr.	0.17	0.02	12.71	10

Tabelle 23:

NBD-Octreotid (1 μ M) vorinkubiert mit
CO 611 (10 μ M)

		rel. Fluores- zenzintens. Lumen/Zelle	s	S_{rel} (%)	n
V ₁	Kontrolle	3.66	0.55	15.05	10
	+ CO 611	0.29	0.06	20.89	7
V ₂	Kontrolle	3.02	0.22	7.27	10
	+ CO 611	0.36	0.06	16.83	6
V ₃	Kontrolle	2.47	0.14	5.72	10
	+ CO 611	0.37	0.04	10.97	10

Tabelle 24:

NBD-Octreotid (1 μ M) vorinkubiert mit
Loperamid (10 μ M)

		rel. Fluores- zenzintens. Lumen/Zelle	s	S_{rel} (%)	n
V ₁	Kontrolle	3.66	0.55	15.05	10
	+ Loper.	0.27	0.06	20.52	10
V ₂	Kontrolle	3.02	0.22	7.27	10
	+ Loper	0.31	0.05	17.38	10
V ₃	Kontrolle	2.47	0.14	5.72	10
	+ Loper	0.32	0.04	13.78	10

Tabelle 25:

NBD-Octreotid (1 μ M) vorinkubiert mit
Verapamil (50 μ M)

		rel. Fluores- zenzintens. Lumen/Zelle	s	S_{rel} (%)	n
V ₁	Kontrolle	2.40	0.14	5.94	10
	+ Verap.	0.36	0.06	17.62	10
V ₂	Kontrolle	3.66	0.55	15.05	10
	+ Verap.	0.33	0.06	17.26	10
V ₃	Kontrolle	3.02	0.22	7.27	10
	+ Verap.	0.29	0.05	16.33	10
V ₄	Kontrolle	2.47	0.14	5.72	10
	+ Verap.	0.30	0.05	16.6	10

Tabelle 26:

NBD-Octreotid (1 μ M) vorinkubiert mit
Cyclosporin A (10 μ M)

		rel. Fluores- zenzintens. Lumen/Zelle	s	S_{rel} (%)	n
V ₁	Kontrolle	3.66	0.55	15.05	10
	+ CSA	0.26	0.04	15.55	10
V ₂	Kontrolle	3.02	0.22	7.27	10
	+ CSA	0.27	0.05	17.68	10
V ₃	Kontrolle	2.47	0.14	5.72	10
	+ CSA	0.31	0.04	14.54	10

Tabelle 27:

NBD-Octreotid (1 μ M) vorinkubiert mit
PSC 833 (10 μ M)

		rel. Fluores- zenzintens. Lumen/Zelle	s	S _{rel} (%)	n
V ₁	Kontrolle	3.66	0.55	15.05	10
	+ PSC	0.32	0.06	19.57	10
V ₂	Kontrolle	3.02	0.22	7.27	10
	+ PSC	0.28	0.05	18.03	10
V ₃	Kontrolle	2.47	0.14	5.72	10
	+ PSC	0.33	0.06	16.80	10

Tabelle 28

Bodipy-Verapamil (1 μ M) vorinkubiert mit
Octreotid (10 μ M)

		rel. Fluores- zenzintens. Lumen/Zelle	s	S _{rel} (%)	n
V ₁	Kontrolle	2.11	0.34	16.26	10
	+ Octr.	0.30	0.05	16.26	10
V ₂	Kontrolle	1.93	0.21	11.10	10
	+ Octr.	0.32	0.05	14.54	10
V ₃	Kontrolle	2.06	0.16	7.76	10
	+ Octr.	0.33	0.05	16.09	10
V ₄	Kontrolle	2.06	0.16	7.76	10
	+ Octr.	0.34	0.04	12.90	10

Tabelle 29:

NBD-Octreotid (1 μ M) vorinkubiert mit
LTC₄ (0.3 μ M)

		rel. Fluores- zenzintens. Lumen/Zelle	s	S _{rel} (%)	n
V ₁	Kontrolle	3.66	0.55	15.05	10
	+ LTC ₄	0.39	0.07	17.75	10
V ₂	Kontrolle	3.02	0.22	7.27	10
	+ LTC ₄	0.37	0.06	16.93	10
V ₃	Kontrolle	2.47	0.14	5.72	10
	+ LTC ₄	0.33	0.04	11.63	10

Tabelle 30:

Fl-Mtx (2 μ M) vorinkubiert mit Octreotid
(10 μ M)

		rel. Fluores- zenzintens. Lumen/Zelle	s	S _{rel} (%)	n
V ₁	Kontrolle	2.46	0.20	8.01	10
	+ Octr.	0.30	0.04	12.22	10
V ₂	Kontrolle	2.46	0.20	8.01	10
	+ Octr.	0.08	0.02	27.67	10
V ₃	Kontrolle	2.17	0.20	9.36	10
	+ Octr.	0.22	0.04	17.25	10

6 LITERATURVERZEICHNIS

A

- AGUILAR-BRYAN, L.; NICHOLS, C.G. und WECHSLER, S.W.: Cloning of the β -cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. In: *Science* 268 (1995), S. 423-426.
- ALBERT, R.; MARBACH, P.; BAUER, W.; BRINER, U.; FRICKER, G.; BRUNS, C. und PLESS, J.: SDZ CO 611: A highly potent glycosylated analog of somatostatin with improved oral activity. In: *Life Sciences* 53 (1993), S. 517-525.
- ALBERT, Z.M.; ORLOWSKI, M.; RZUCIDLO, Z. und ORLOWSKI, J.: Studies on γ -glutamyl-transpeptidase activity and its histochemical localization in the central nervous system in man and different animal species. In: *Acta Histochem.* 25 (1966), S. 312-320.
- ALMQUIST, K.C.; LOE, D.W.; HIPFNER, D.R.; MACKIE, J.E.; COLE, S.P.C. und DEELEY, R.G.: Characterization of the M_r 190,000 multidrug resistance protein (MRP) in drug-selected and transfected human tumor cells. In: *Cancer Res.* 55 (1995), S. 102-110.
- AMBUDKAR, S.V.; DEY, S.; HRYCYNA, A.; RAMACHANDRA, M.; PASTAN, I. und GOTTESMAN, M.M.: Biochemical, cellular and pharmacological aspects of the multidrug transporter. In: *Annu. Rev. Pharmacol.Toxicol.* 39 (1999), S. 361-398.
- ANDERSCH, M.A. und SZCZYPINSKI, A.J.: Use of p-nitrophenyl phosphat substrate in determination of serum acid phosphatase. In: *A. J. Clin. Pathol.* 17 (1947), S. 571ff.
- ARACHINAL-MATTHEIS, A.; RZEPKA, R.W.; WATANABE, T.; KOKUBU, N.; ITOH, Y.; COMBATES, N.J.; BAIR, K.W. und COHEN, D.: Analysis of the interactions of SDZ PSC 833 ([3'keto-Bmt1]-Val2]-Cyclosporine), a multidrug-resistance modulator, with P-glycoprotein. In: *Oncol. Res.* 7 (1995), S. 603-610.
- ARTHUR, F.E.; SHIVERS, R.R. und BOWMAN, P.D.: Astrocyte-mediated induction of tight junctions in brain capillary endothelium: an efficient in vitro model. In: *Dev. Brain Res.* 36 (1987), S. 155-159.
- AUDUS, K.L. und BORCHARDT, R.T.: Characterization of an in vitro blood-brain barrier model system for studying drug transport and metabolism. In: *Pharm. Res.* 3 (1986), S. 81-87.
- AUDUS, K.L. und BORCHARDT, R.T.: Bovine brain microvessel endothelial cell monolayers as a model system for the blood-brain barrier. In: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 507 (1987), S. 9-18.

B

- BAKOS, E.; HEGEDÜS, T.; HOLLÓ, Z.; WELKER, E.; TUSNÁDY, G.E.; ZAMAN, G.J.R. und FLENS, M.J.: Membrane topology and glycosylation of the human multidrug resistance-associated protein. In: *J. Biol. Chem.* 271 (1996), S. 12322-12326.
- BANKS, W.; SCHALLY, A.; BARRERA, C.; FASOLD, M.; DURHAM, D.; CSERNUS, V.; GROOT, K. und KASTIN, J.: Permeability of the murine blood-brain barrier to some octapeptide analogs of somatostatin. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990), S. 6762-6766.

- BARAKA, O.Z.; MAHMOUD, B.M.; MARSCHKE, C.K.; GEARY, T.G.; HOMEIDA, M.M. und WILLIAMS, J.F.: Ivermectin distribution in the plasma and tissue of patients infected with *Onchocerca volvulus*. In: *Europ. J. Clin. Pharmacol.* 50 (1996), S. 407-410.
- BARRAND, M.A.; RHODES, T.; CENTER, M.S. und TWENTYMAN, P.R.: Chemosensitisation and drug accumulation effects of cyclosporin A, PSC 833 and verapamil in human MDR large cell lung cancer cells expressing a 190k membrane protein distinct from P-glycoprotein. In: *Eur. J. Cancer* 29A (1993), S. 408-415.
- BARRAND, M.A.; HEPPEL-PARTON, A.C.; WRIGHT, K.A.; RABBITS, P.H. und TWENTYMAN, P.R.: A 190-kilodalton protein overexpressed in non-P-glycoprotein-containing multidrug-resistant cells and its relationship to the MRP gene. In: *J. Natl. Cancer Inst.* 86 (1994), S. 110-117.
- BARRAND, M.A.; BAGRIJ, T. und NEO, S.Y.: Multidrug resistance-associated protein: a protein distinct from P-glycoprotein involved in cytotoxic drug expulsion. In: *Gen. Pharmac.* 28 (1997), Nr. 5, S. 639-645.
- BEAL, M.F.: Somatostatin in neurogenerative illness. In: *Metabolism [Suppl 2]* 39 (1990), S. 116-119.
- BEGLEY, D.J.; LECHARDEUR, D.; CHEN, Z.D.; ROLLINSON, C.; BARDOUL, M.; ROUX, F.; SCHERMAN, D. und ABBOTT, N.J.: Funktional expression of P-glycoprotein in an immortalised cell line of rat brain endothelial cells, RBE4. In: *J. Neurochem.* 67 (1996), Nr. 3, S. 988-995.
- BESSEY, O.A.; LOWRY, O.H. und BROCK, M.J.: A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. In: *J. Biol. Chem.* 164 (1946), S. 321ff.
- BETZ, A.L.; FIRTH, J. und GOLDSTEIN, G.W.: Polarity of the blood-brain barrier : distribution of enzymes between the luminal and antiluminal membranes of brain capillary endothelial cells. In: *Brain Res.* 192 (1980), S. 17-28.
- BEUCKMANN, C.; HELLWIG, S. und GALLA, H.-J.: Induction of the blood-brain-barrier-associated enzyme alkaline phosphatase in endothelial cells from cerebral capillaries is mediated via cAMP. In: *Eur. J. Biochem.* 229 (1995), S. 641-644.
- BIEGEL, D.; SPENCER, D.D. und PACHER, J.S.: Isolation and culture of human brain microvessel endothelial cells for the study of blood-brain barrier properties in vitro. In: *Brain Res.* 692 (1995), S. 183-189.
- BOESCH, D.; GAVÉRAUX, C.; JACHEZ, B.; POURTIER-MANZANEDO, A.; BOLLINGER, P. und LOOR, F.: In vivo circumvention of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance of tumor cells with SDZ PSC 833. In: *Cancer Res.* 51 (1991), S. 4226-4233.
- BOESCH, D. und LOOR, F.: Extent and persistence of P-glycoprotein inhibition in multidrug-resistant P388 cells after exposure to resistance-modifying agents. In: *Anticancer-Drugs* 5 (1994), Nr. 2, S. 229-238.
- BOOTE, D.J.; DENNIS, I.F.; TWENTYMAN, P.R.; OSBORNE, R.J.; LABURTE, C.; HENSEL, S.; SMYTH, J.F.; BRAMPTON, M.H. und BLEEHEN, N.M.: Phase I study of etoposid with SDZ PSC 833 as a modulator of multidrug resistance in patients with cancer. In: *J. Clin. Oncol.* 14 (1996), S. 610-618.

- BORST, P.; EVERS, R.; KOOL, M. und WIJNHOLDS, J.: The multidrug resistance protein family. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1461 (1999), S. 347-357.
- BORST, P.; EVERS, R.; KOOL, M. und WIJNHOLDS, J.: A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. In: *J. Natl. Cancer Inst.* 92 (2000), Nr. 16, S. 1295-1302.
- BOWMAN, P.; BETZ, A.L.; AR, D.; WOLINSKY, J.; PENNY, J.; SHIVERS, R. und GOLDSTEIN, G.W.: Primary culture of capillary endothelium from rat brain. In: *In Vitro* 17 (1981), Nr. 4, S. 353-362.
- BRADBURY, M.W.B.: The blood-brain barrier, transport across the cerebral endothelium. In: *Circulation Research* 57 (1985), Nr. 2, S. 213-222.
- BRADFORD, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Anal. Biochem.* 72 (1976), S. 248-254.
- BRENDEL, K.; MEEZAN, E. und CARLSON, E.: Isolated brain microvessels: a purified, metabolically active preparation from bovine cerebral cortex. In: *Science* 185 (1974), S. 953-955.
- BRIGHTMAN, M.W. und REESE, T.S.: Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. In: *J. Cell Biol.* 40 (1969), S. 648-677.
- BÜCHLER, M.; KÖNIG, J.; BROM, M.; KARTENBECK, J.; SPRING, H.; HORIE, T. und KEPLER, D.: cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. In: *J. Biol. Chem.* 271 (1996), S. 15091-15098.

C

- CAMPBELL, W.C. und BENZ, G.W.: Ivermectin: A review of efficacy and safety. In: *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 7 (1984), S. 1-16.
- CAMPBELL, W.C.: Ivermectin: an update. In: *Parasitology Today* 1 (1985), S. 10-16.
- CASPERS, M.L. und DIGLIO, C.A.: Expression of γ -glutamyltranspeptidase in a transformed rat cerebral endothelial cell line. In: *Biochim. Biophys. Acta* 803 (1984), S. 1-6.
- CATALÁN, R.E.; MARTINEZ, A.M.; ARAGONÉS, M.D.; MIGUEL, B.G. und ROBLES, A.: Insulin action on brain microvessels; effect on alkaline phosphatase. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 150 (1988), S. 583-590.
- CERVOS-NAVARRO, J.: Elektronenmikroskopischen Befund an den Capillaren der Hirnrinde. In: *Arch. Psychiatr. Nervenkr.* 204 (1963), S. 484-504.
- CHILDS, S. und LING, V.: Duplication and evolution of the P-glycoprotein genes in pig. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1307 (1996), S. 205-212.
- CHIU, S.H.L.; CARLIN, J.R.; TAUB, R.; SESTOKAS, E.; ZWEIG, J.; VAN DEN HEUVAL, W.J.A. und JACOB, T.A.: Comparative metabolic disposition of ivermectin in fat tissues of cattle, sheep, and rats. In: *Drug Metab. and Dispos.* 16 (1988), S. 728-736.
- CLAUDE, P. und GOODENOUGH, D.A.: Fracture faces of zonae occludentes from tight and leaky epithelia. In: *J. Cell Biol.* 58 (1973), S. 390-400.

- COLE, S.P.C.; BHARDWAJ, G.; GERLACH, J.H.; MACKIE, J.E.; GRANT, C.E.; ALMQUIST, K.C.; STEWART, A.J.; KURZ, E.U.; DUNCAN, A.M.V. und DEELEY, R.G.: Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. In: *Science* 258 (1992), S. 1650-1654.
- COLE, S.P.C. und DEELEY, R.G.: Multidrug resistance-associated protein: sequence correction. In: *Science* 260 (1993), S. 879.
- COLE, S.P.C.; SPARKS, K.E.; FRASER, K.; LOE, D.W.; GRANT, C.E.; WILSON, G.M. und DEELEY, R.G.: Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. In: *Cancer Res.* 54 (1994), S. 5902-5910.
- COLE, S.P.C. und DEELEY, R.G.: Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP. In: *BioEssays* 20.11 (1998), S. 931-940.
- CORDON-CARDO, C.; O'BRIEN, J.P.; CASALS, D.; RITTMAN-GRAUER, L.; BIEDLER, J.L.; MELAMED, M.R. und BERTINE, J.R.: Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at the blood-brain barrier. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989), S. 695-698.
- CRONE, C.: The permeability of capillaries in various organs as determined by the use of the indicator dilution method. In: *Acta Physiol. Scand.* 58 (1963), S. 292-305.
- CRONE, C.: The permeability of brain capillaries to non electrolytes. In: *Acta Physiol. Scand.* 64 (1965), S. 407-417.

D

- DALLAIRE, L.; TREMBLAY, L. und BÉLIVEAU, R.: Purification and characterization of metabolically active capillaries of the blood-brain barrier. In: *Biochem. J.* 276 (1991), S. 745-752.
- DAVIES, P.; KATZMAN, R. und TERRY, R.D.: Reduced somatostatin like immunoreactivity in cerebral cortex from cases of Alzheimer's disease and Alzheimer senile dementia. In: *Nature* 288 (1980), S. 279-280.
- DE BOER, A.G. und BREIMER, D.D.: Reconstitution of the blood-brain barrier in cell culture for studies of drug transport and metabolism. In: *Ad. Drug Deliv. Rev.* 22 (1996), S. 251-264.
- DE LANGE, E.C.M.; DANHOF, M.; DE BOER, A.G. und BREIMER, D.D.: Critical factors of intracerebral microdialysis as a technique to determine the pharmacokinetics of drugs in rat brain. In: *Brain. Res.* 666 (1994), S. 1-8.
- DE LANGE, E.C.M.; HESSELINK, M.B.; DANHOF, M.; DE BOER, A.G. und BREIMER, D.D.: The use of intracerebral microdialysis to determine the changes in blood-brain barrier transport characteristics. In: *Pharm. Res.* 12 (1995), S. 129-133.
- DE LANGE, E.C.; DANHOF, M.; DE BOER, A.G. und BREIMER, D.D.: Methodological considerations of intracerebral microdialysis in pharmacokinetic studies on drug transport across the blood-brain barrier. In: *Brain Res. Brain Res. Rev.* 25 (1997), Nr. 1, S. 27-49.

- DE LANGE, E.C.M.; DE BOCK, G.; SCHINKEL, A.H.; DE BOER, A.G. und BREIMER, D.D.: BBB transport and P-glycoprotein functionality using MDR1A (-/-) and wild-type mice. Total brain versus microdialysis concentration profiles of rhodamine-123. In: *Pharm. Res.* 15 (1998), Nr. 11, S. 1657-1665.
- DEBAULT, L.E.; KAHN, L.E.; FROMMES, S.P. und CANCELLA, P.A.: Cerebral microvessels and derived cells in tissue culture: isolation and preliminary characterization. In: *In Vitro* 15 (1979), Nr. 7, S. 473-487.
- DEBAULT, L.E. und CANCELLA, P.A.: γ -Glutamyltranspeptidase in isolated brain endothelial cells: induction by glial cells in vitro. In: *Science* 207 (1980), S. 653-655.
- DEBAULT, L.E.; HENRIQUEZ, E.; HART, M.N. und CANCELLA, P.A.: Cerebral microvessels and derived cells in tissue culture. II. Establishment, identification and preliminary characterization of an endothelial cell line. In: *In Vitro* 17 (1981), S. 480-494.
- DEHOUCK, M.P.; MÉRESSE, S.; DELORME, P.; FRUCHART, J.C. und CECCELLI, R.: An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. In: *J. Neurochem.* 54 (1990), S. 1798-1801.
- DEMPSEY, E.W. und WISLOCKI, G.B.: An electron microscopic study of the blood-brain barrier in the rat, employing silver nitrate as a vital stain. In: *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1 (1955), S. 245-256.
- DESRAYAUD, S.; DE LANGE, E.C.; LEMAIRE, M.; BRUELISAUER, A.; DE BOER, A.G. und BREIMER, D.D.: Effect of the MDR1aP-glycoprotein gene disruption on the tissue distribution of SDZ PSC 833, a multidrug resistance-reversing agent, in mice. In: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285 (1998), Nr. 2, S. 438-443.
- DIDIER, A.D. und LOOR, F.: Decreased biotolerability for ivermectin and cyclosporin A in mice exposed to potent P-glycoprotein inhibitors. In: *Int. J. Cancer* 63 (1995), S. 263-267.
- DJURICIC, B.M. und MRSULJA, B.B.: Enzymatic activity of the brain: Microvessels vs total forebrain homogenate. In: *Brain Res.* 138 (1977), S. 561-564.
- DOROVINI-ZIS, K.; PRAMEYA, R. und BOWMAN, P.D.: Culture and characterization of microvascular endothelial cells derived from human brain. In: *Lab. Invest.* 64 (1991), S. 425-436.
- DRAPER, M.P.; MARTELL, R.L. und LEVY, S.B.: Active efflux of the free acid form of the fluorescent dye 2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein in multidrug-resistance-protein-overexpressing murine and human leukemia cells. In: *Eur. J. Biochem.* 243 (1997), S. 219-224.
- DUBIN, I.N. und JOHNSON, F.B.: Chronic idiopathic jaundice with unidentified pigment in liver cells. In: *Medicine* 33 (1954), S. 155-197.

E

- EHRlich, P.: Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus; eine farbenanalytische Studie. In: *Berlin: Hirschwald* (1885).
- EPPELBAUM, J.: Somatostatin receptors in the central nervous system. In: WEIL, C.: Basic and clinical aspects of neuroscience. Bd. 4. Springer Verlag, 1992, S. 17-28

- ESTRADA, C.; TRIGUERO, D.; MUNOZ, J. und SURESDA, A.: Acetylcholinesterase-containing fibers and choline acetyltransferase activity in isolated cerebral microvessels from goats. In: *Brain Res.* 453 (1988), S. 275-280.
- ETTE, E.I.; THOMAS, W.O.A. und ACHUMBA, J.I.: Ivermectin: a long lasting microfilaricidal agent. In: *DICP* 24 (1990), S. 426-433.
- EUROPÄISCHES ARZNEIBUCH, EuAB:, Nachtrag 1999
- EVERS, R.; ZAMAN, G.J.; VAN DEEMTER, L.; JANSEN, H.; CALAFAT, J. und OOMEN, L.C.: Basolateral localization and export activity of the human multidrug resistance-associated protein in polarized pig kidney cells. In: *J. Clin. Invest.* 97 (1996), S. 1211-1218.

F

- FENSTERMACHER, J.D.; BLASBERG, R.G. und PATLAK, C.S.: Methods for quantifying the transport of drugs across the blood-brain system. In: *Pharmacol. Ther.* 14 (1981), S. 217-248.
- FINLEY, J.C.W.; MADERDRUT, J.L.; ROGER, L.J. und PETRUSZ, P.: The immunocytochemical localization of somatostatin-containing neurons in the rat central nervous system. In: *Neuroscience* 6 (1981), S. 2173-2192.
- FLENS, M.J.; ZAMAN, G.J.R.; VAN DER VALK, P.; IZQUIERDO, M.A.; SCHROEIJERS, A.B.; SCHEFFER, G.L.; VAN DER GROEP, P.; DE HAAS, M.; MEIJER, C.J.L. und SCHEPER, R.J.: Tissue distribution of the multidrug resistance-associated protein. In: *Am. J. Pathol.* 148 (1996), S. 1237-1247.
- FORD, J.M. und HAIT, W.N.: Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. In: *Pharmacol. Rev.* 42 (1990), S. 155-199.
- FRACASSO, P.M.; WESTERVELDT, P.; FEARS, C.A.; ROSEN, D.M.; ZUHOWSKI, E.G.; CAZENAVE, L.A.; LITCHMAN, M. und EGORIN, M.J.: Phase I study of paclitaxel in combination with a multidrug resistance modulator, PSC 833 (Valspodar), in refractory malignancies. In: *J. Clin. Oncol.* 18 (2000), Nr. 5, S. 1124.
- FRICKER, G.; DREWE, J.; VONDERSCHER, J. und BEGLINGER, C.: Enteral absorption of octreotide. In: *Brit. J. Pharmacol.* 105 (1992), S. 783-786.
- FRICKER, G.; DUBOST, V.; SCHWAB, D.; BRUNS, C. und THIELE, C.: Heterogeneity in hepatic transport of somatostatin analog octapeptides. In: *Hepatology* 20 (1994), S. 191-200.
- FRICKER, G.; GUTMANN, H.; DROULLE, A.; DREWE, J. und MILLER, D.S.: Epithelial transport of anthelmintic ivermectin in a novel model of isolated proximal kidney tubules. In: *Pharm. Res.* 16 (1999), Nr. 10, S. 1570-1575.
- FUESSL, H.S.; DOMIN, J. und BLOOM, S.R.: Oral absorption of the somatostatin analogue SMS 201-995: theoretical and practical implications. In: *Clin. Sci.* 72 (1987), S. 255-257.

G

- GAILLARD, P.J.; VAN DER SANDT, I.C.J.; VOORWINDEN, L.H.; VU, D.; NIELSEN, J.L.; DE BOER, A.G. und BREIMER, D.D.: Astrocytes increase the functional expression of P-glycoprotein in an in vitro model of the blood-brain barrier. In: *Pharm. Res.* 17 (2000), Nr. 10, S. 1198-1205.
- GAO, M.; LOE, D.W.; GRANT, C.E.; COLE, S.P.C. und DEELEY, R.G.: Reconstitution of ATP-dependent leukotriene C4 transport by co-expression of both half-molecules of human multidrug resistance protein in insect cells. In: *Journal of Biological Chemistry* 271 (1996), Nr. 44, S. 27782-27787.
- GAO, M.; YAMAZAKI, M.; LOE, D.W.; WESTLAKE, C.J.; GRANT, C.E.; COLE, S.P.C. und DEELEY, R.G.: Multidrug resistance protein - identification of regions required for active transport of leukotriene C4. In: *Journal of Biological Chemistry* 273 (1998), Nr. 17, S. 10733-10740.
- GARBERG, P.: In vitro models of the blood-brain barrier. In: *ATLA* 26 (1998), S. 821-847.
- GOETZ, J.E.; WARREN, J.; ESTRADA, C.; ROBERTS, E. und KRAUSE, D.N.: Long-term serial cultivation of arterial and capillary endothelium from adult bovine brain. In: *In Vitro Cell Dev. Biol.* 21 (1985), S. 172-180.
- GOLDEN, P.L. und PARDRIDGE, W.M.: P-glycoprotein on astrocyte foot processes of unfixed isolated human brain capillaries. In: *Brain Research* 819 (1999), S. 143-146.
- GOLDMANN, E.E.: Die äußere und innere Sekretion des gesunden und kranken Organismus im Lichte der vitalen Färbung. In: *Beitr. Klin. Chirurg* 64 (1909), S. 192-265.
- GOLDMANN, E.E.: Vitalfärbung am Zentral-Nervensystem. In: *Abh. Preuss. Akad. Wiss., Phys.-Math.* KL I. (1913), S. 1-60.
- GOLDSTEIN, G.W.; WOLINSKY, J.; CSEJTEY, J. und DIAMOND, I.: Isolation of metabolically active capillaries from rat brain. In: *J. Neurochem.* 25 (1975), S. 715-717.
- GOLDSTEIN, G.W. und BETZ, A.L.: The blood-brain barrier. In: *Sci. Am.* 255 (1986), S. 74-83.
- GOLDSTEIN, L.J.; PASTAN, I. und GOTTESMANN, M.M.: Multidrug resistance in human cancer. In: *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 12 (1992), S. 243-253.
- GOTTESMAN, M.M. und PASTAN, I.: Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. In: *Annu. Rev. Biochem.* 62 (1993), S. 385-427.
- GRANT, C.E.; VALDIMARSSON, G.; HIPFNER, K.; ALMQUIST, K.C.; COLE, S.P.C. und DEELEY, R.G.: Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. In: *Cancer Res.* 54 (1994), S. 357-361.
- GUTMANN, H.; MILLER, D.S.; DREWE, J.; TÖRÖK, M. und FRICKER, G.: Interaction of HIV-protease inhibitors with ATP-dependent drug export proteins. In: *Mol. Pharmacol.* 56 (1999), S. 383-389.
- GUTMANN, H.; MILLER, D.S.; DROULLE, A.; DREWE, J.; FAHR, A. und FRICKER, G.: P-glycoprotein- and mrp2-mediated octreotid transport in renal proximal tubule. In: *Brit. J. Pharmacol.* 129 (2000), S. 251-256.

H

- HARRIS, A.G.: Somatostatin and somatostatin analogues: pharmacokinetics and pharmacodynamic effects. In: *Gut* 35 (1994), S. S1-S4.
- HIGGINS, C.F.: ABC transporters - from microorganisms to man. In: *Annu. Rev. Cell Biol.* 8 (1992), S. 67-113.
- HIGGINS, C.F. und GOTTESMAN, M.M.: Is the multidrug transporter a flippase?. In: *Trends Biochem. Sci* 17 (1992), S. 18-21.
- HOLLÓ, Z.; HOMOLYA, L.; HEGEDÜS, T. und SARKADI, B.: Transport properties of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in human tumor cells. In: *FEBS Letters* 383 (1996), S. 99-104.
- HOUGARD, J.M.; POUDIOUGO, P.; ZERBO, G.; MEYER, R.; GUILLET, P.; AGOUA, H.; SEKETELI, A.; AKBOBOUA, A.; SOWAH, S. und SAMBA, E.M.: Control of onchocerciasis vectors in West Africa: description of the logistics adapted for a large-scale public health program. In: *Sante* 4 (1994), S. 389-398.
- HOYER, J.; POPP, R.; MEYER, J.; GALLA, H. und GÖGELEIN, H.: Angiotensin II, vasopressin and GTP[γ -S] inhibit inward-rectifying K⁺ channels in porcine cerebral capillary endothelial cells. In: *J. Membrane Biol.* 123 (1991), S. 55-62.
- HUAI YUN, H.; SECREST, D.T.; MARK, K.S.; CARNEY, D.; BRANDQUIST, C.; ELMQUIST, W.F. und MILLER, D.W.: Expression of multidrug resistance-associated protein (MRP) in brain microvessel endothelial cells. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243 (1998), S. 816-820.
- HUBER, M.; GUHLMANN, A.; JANSEN, P.L.M. und KEPPLER, D.: Hereditary defect of hepatobiliary cysteinyl leukotriene elimination in mutant rats with defective hepatic anion excretion. In: *Hepathology* 7 (1987), S. 224-228.
- HUGHEY, R.P.; RANKIN, B.B.; ELCE, J.S. und CURTHOYS, N.P.: Specificity of a particulate rat renal peptidase and its localization along with other enzymes of mercapturic acid synthesis. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 186 (1978), S. 211-217.

I

- ISHIKAWA, T.; MÜLLER, M.; KLÜNEMANN, C.; SCHAUB, T. und KEPPLER, D.: ATP-dependent primary active transport of cysteinyl leukotrienes across liver canalicular membrane. Role of the ATP-dependent transport system for the glutathione S-conjugates. In: *J. Biol. Chem.* 265 (1990), S. 19279-19286.

J

- JAEHDE, U.; MASEREEUW, R.; DE BOER, A.G.; FRICKER, G.; NAGELKERKE, J.F.; VON-DERSCHER, J. und BREIMER, D.D.: Quantification and visualization of the transport of octreotide, a somatostatin analogue, across monolayers of cerebrovascular endothelial cells. In: *Pharm. Research* 11 (1994), Nr. 3, S. 442-448.

- JAFFE, E.A.; HOYER, L.W. und NACHMAN, R.L.: Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. In: *J. Clin. Invest.* 52 (1973), S. 2757-2764.
- JAFFE, E.A.; HOYER, L.W. und NACHMAN, R.L.: Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (1974), S. 1906-1909.
- JAFFE, E.A.: Synthesis of factor VIII by endothelial cells. In: JAFFE, E.A.: *Biology of endothelial cells*. Martinus Nijhoff Publishers Boston, 1984, S. 209-214
- JANSEN, P.L.M., PETERS, W.H.M. und LAMERS, W.H.: Hereditary chronic conjugated hyperbilirubinemia in mutant rats caused by defective hepatic anion transporter. In: *Hepathology* 5 (1985), S. 573-579.
- JANZER, R.C. und RAFF, M.C.: Astrocytes induces blood-brain barrier properties in endothelial cells. In: *Nature* 325 (1987), S. 253-257.
- JEDLITSCHKY, G.; LEIER, I.; BUCHHOLZ, U.; BARNOUIN, K.; KURZ, G. und KEPPLER, D.: Transport of glutathione, glucuronate and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. In: *Cancer Research* 56 (1996), S. 988-994.
- JETTÉ, L.; TÊTU, B. und BÉLIVEAU, R.: High levels of P-glycoprotein detected in isolated brain capillaries. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1150 (1993), S. 147-154.
- JETTÉ, L.; POULIOT, J.F.; MURPHY, G.F. und BELIVEAU, R.: Isoform 1 (mdr3) is the major form of P-glycoprotein expressed in mouse brain capillaries. In: *Biochem. J.* 305 (1995a), S. 761-766.
- JETTÉ, L.; MURPHY, G.F.; LECLERC, J. und BELIVEAU, R.: Interaction of drugs with P-glycoprotein in brain capillaries. In: *Biochem. Pharmacol.* 50 (1995b), S. 1701-1709.
- JOHANSSON, O.; HOKFELT, T. und ELDE, R.P.: Immunohistochemical distribution of somatostatin-like immunoreactivity in the central nervous system of the adult rat. In: *Neuroscience* 13 (1984), S. 265-339.
- JOÓ, F. und KARNUSHINA, I.: A procedure for the isolation of capillaries from rat brain. In: *Cytobios* 8 (1973), S. 41-48.
- JOÓ, F.: The blood-brain barrier in vitro: ten years of research on microvessels isolated from the brain. In: *Neurochem. Int.* 7 (1985), Nr. 1, S. 1-25.
- JOÓ, F.: The cerebral microvessels in culture, an update. In: *J. Neurochem* 58 (1992), S. 1-17.
- JULIANO, R.L. und LING, V.: A surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cell mutants. In: *Biochim. Biophys. Acta* 455 (1976), S. 152-162.

K

- KAKEE, A.; TERASAKI, T. und SUGIYAMA, Y.: Organic anion transport system acting as an efflux pump at the blood-brain barrier: demonstration by a newly developed brain efflux index (BEI) method. In: *Proc. Int. Symp. Control Release Bioact. Mater* 22 (1995), S. 16-18.
- KAKEE, A.; TERASAKI, T. und SUGIYAMA, Y.: Brain efflux index as a novel method of analyzing efflux transport at the blood-brain barrier. In: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277 (1996), S. 1550-1559.

- KAMISAKO, T.; LEIER, I.; CUI, Y.; KÖNIG, J.; BUCHHOLZ, U.; HUMMEL-EISENBEISS, J. und KEPPLER, D.: Transport of monoglucuronosyl and bisglucuronosyl bilirubin by recombinant human and rat multidrug resistance protein 2. In: *Hepatology* 30 (1999), S. 485-490.
- KELLER, R.P.; ALTERMATT, H.J.; NOOTER, K.; POSCHMANN, G.; LAISSUE, J.A.; BOLLINGER, P. und HIESTAND, P.C.: SDZ PSC 833, a non-immunosuppressive cyclosporine: its potency in overcoming P-glycoprotein-mediated multidrug resistance of murine leukemia. In: *Int. J. Cancer* 50 (1992), S. 593-597.
- KEPPLER, D. und KARTENBECK, J.: The canalicular conjugate export pump encoded by the *cmrp/cmoat* gene. In: *Progress in liver diseases* 14 (1996), S. 55-67.
- KEPPLER, D. und KÖNIG, J.: Expression and localization of the conjugate export pump encoded by the MRP2 (cMRP/cMOAT) gene in liver. In: *FASEB J.* 11 (1997), S. 509-516.
- KEPPLER, D.; LEIER, I. und JEDLITSCHKY, G.: Transport of glutathion conjugates and glucuronides by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. In: *Biol. Chem.* 378 (1997), S. 787-791.
- KEPPLER, D.; JEDLITSCHKY, G. und LEIER, I.: Transport function and substrate specificity of multidrug resistance protein. In: *Methods of Enzymology* 292 (1998), S. 607-616.
- KÖHLER, E.; DUBEROW-DREWE, M.; DREWE, J.; LOUBATIERES-MARIANI, M.M.; MAZER, N.; GYR, K. und BEGLINGER, C.: Absorption of an aqueous solution of a new synthetic somatostatin analogue administered to man by gavage. In: *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 33 (1987), S. 167-171.
- KOLBER, A.R.; BAGNELL, C.R.; KRIGMAN, M.R.; HAYWARD, J. und MORELL, P.: Transport of sugars into microvessels isolated from rat brain: a model for the blood-brain barrier. In: *J. Neurochem.* 33 (1979), S. 419-432.
- KÖNIG, J.; NIES, A.T.; CUI, Y.; LEIER, I. und KEPPLER, D.: Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrat specificity, and MRP2-mediated drug resistance. In: *Biochim. Biophys. Acta* 146 (1999), S. 377-394.
- KOOL, M.; DE HAAS, M.; SCHEFFER, G.L.; SCHEPER, R.J.; VAN EIJK, M.J.T.; JUIJN, J.A.; BAAS, F. und BORST, P.: Analysis of expression of cMoat (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. In: *Cancer Research* 57 (1997), S. 3537-3547.
- KOOL, M.; VAN DER LINDEN, M.; DE HAAS, M.; BAAS, F. und BORST, P.: Expression of human MRP6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP1, in tissues and cancer cells. In: *Cancer Res.* 59 (1999), S. 175-182.
- KRISHNAMACHARY, N. und CENTER, M.S.: The MRP gene associated with a non-P-glycoprotein multidrug resistance encodes a 190-kDa membrane bound glycoprotein. In: *Cancer Res.* 53 (1993), S. 3658-3661.
- KRIZBAI, I.; SZABÓ, G.; DELI, M.; MADERSPACH, K.; LEHEL, C.; OLÁH, Z.; WOLFF, J.R. und JOÓ, F.: Expression of protein kinase C family members in the cerebral endothelial cells. In: *J. Neurochem.* 65 (1995), Nr. 1, S. 459-462.

- KROGH, A.: The active and passive exchange of inorganic ions through the surface of living cells and through living membranes generally. In: *Proc. R. Soc. Lond. [Biol]* 133 (1946), S. 140-200.
- KUIPERS, F.; ENSERINK, M.; HAVINGA, R.; VAN DER STEEN, A.B.M.; HARDONK, M.J.; FEVERY, J. und VONK, R.J.: Separate transport systems for biliary secretion of sulfated and unsulfated bile acids in the rat. In: *J. Clin. Invest.* 81 (1988), S. 1593-1599.
- KUSUHARA, H.; SUZUKI, H.; TERASAKI, T.; KAKEE, A.; LEMAIRE, M. und SUGIYAMA, Y.: P-glycoprotein mediates the efflux of quinidine across the blood-brain-barrier. In: *J. Pharmacol. Eper. Ther.* 283 (1997), Nr. 2, S. 574-580.
- KUSUHARA, H.; SUZUKI, H.; NAITO, M.; TSURUO, T. und SUGIYAMA, Y.: Characterization of efflux transport of organic anions in a mouse brain capillary endothelial cell line. In: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285 (1998a), S. 1260-1265.
- KUSUHARA, H.; SUZUKI, H. und SUGIYAMA, Y.: The role of P-glycoprotein and canalicular multispecific organic anion transporter in the hepatobiliary excretion of drugs. In: *J. Pharm. Sci.* 87 (1998b), Nr. 9, S. 1025-1040.

L

- LANKAS, G.R.; CARTWRIGHT, M.E. und UMBENHAUER, D.: P-glycoprotein deficiency in a subpopulation of CF-1 mice enhances avermectin-induced neurotoxicity. In: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 143 (1997), S. 357-365.
- LANKAS, G.R.; WISE, L.D.; CARTWRIGHT, M.E.; PIPPERT, T. und UMBENHAUER, D.R.: Placental P-glycoprotein deficiency enhances susceptibility of chemically induced birth defects in mice. In: *Reprod. Toxicol.* 12 (1998), S. 457-463.
- LAUTIER, D.; CANITROT, Y.; DEELEY, R.G. und COLE, S.P.C.: Multidrug resistance mediated by the multidrug resistance protein (MRP) gene. In: *Biochem. Pharmacol.* 52 (1996), S. 967-977.
- LECHARDEUR, D. und SCHERMAN, D.: Functional expression of the P-glycoprotein mdr in primary cultures of bovine cerebral capillary endothelial cells. In: *Cell Biology and Toxicology* 11 (1995), S. 283-293.
- LECHARDEUR, D.; SCHWARTZ, B.; PAULIN, D. und SCHERMAN, D.: Induction of blood-brain barrier differentiation in a rat brain-derived endothelial cell line. In: *Exp. Cell. Res.* 220 (1995), Nr. 1, S. 161-170.
- LECHARDEUR, D.; SCHERMAN, D. und SCHWARTZ, B.: Development and characterization of cellular models of the blood-brain barrier. In: *S.T.P. Pharm. Science* 7 (1997), S. 5-11.
- LEE, J.C.: Evolution in the concept of the blood-brain barrier phenomenon. In: ZIMMERMANN, H.M.: Progress in neuropathology. Bd. 1. New York: Grune und Stratton, 1971, S. 84-145.
- LEIER, I.; JEDLITSCHKY, G.; BUCHHOLZ, U.; COLE, S.P.C.; DEELEY, R.G. und KEPPLER, D.: The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C₄ and structurally related conjugates. In: *J. Biol. Chem.* 269 (1994), S. 27807-27810.

- LEIER, I.; HUMMEL-EISENBEISS, J.; CUI, Y. und KEPPLER, D.: ATP-dependent para-aminohippurate transport by apical multidrug resistance protein MRP2. In: *Kidney International* 57 (2000), S. 1636-1642.
- LEVIN, V.A.: Relationship of octanol/water partition coefficient and molecular weight to rat brain capillary permeability. In: *J. Med. Chem.* 23 (1980), S. 682-684.
- LOE, D.W.; DEELEY, R.G. und COLE, S.P.C.: Biology of the multidrug resistance-associated protein, MRP. In: *European Journal of Cancer* 32A (1996a), Nr. 6, S. 945-957.
- LOE, D.W.; ALMQUIST, K.C.; DEELEY, R.G. und COLE, S.P.C.: Multidrug resistance protein (MRP)-mediated transport of leucotrien C4 and chemotherapeutic agents in membrane vesicles. Demonstration of glutathion-dependent vincristine transport. In: *J. Biol. Chem.* 271 (1996b), S. 9675-9682.

M

- MADARA, J.L.: Tight junction dynamics: is paracellular transport regulated?. In: *Cell* 53 (1988), S. 497-498.
- MASEREEUW, R.; RUSSEL, F.G. und MILLER, D.S.: Multiple pathways of organic anion secretion in renal proximal tubule revealed by confocal microscopy. In: *Am. J. Physiol.* 271 (1996), S. F1173-F1182.
- MASEREEUW, R.; TERLOUW, S.; VAN AUBEL, R.A.; RUSSEL, F.G. und MILLER, D.S.: Endothelin B receptor-mediated regulation of ATP-driven drug secretion in renal proximal tubule. In: *Mol. Pharmacol.* 57 (2000), S. 59-67.
- MASON, J.: Pharmacology of cyclosporine (Sandimmune). VII. Pathophysiology and Toxicology of cyclosporine in humans and animals. In: *Pharmacol. Rev.* 42 (1989), Nr. 3, S. 423-434.
- MASON, J.: The pathophysiology of Sandimmune (cyclosporin) in man und animals. In: *Pediatr. Nephrol.* 4 (1990), S. 554-574.
- MATON, P.N.; ARAKAKI, R.F.: Therapeutic use of somatostatin and octreotide acetat in neuroendocrine tumors. In: WEIL, C.: Basic and clinical aspects of neuroscience. Bd. 4. Springer Verlag, 1992
- MAYER, R.; KARTENBECK, J.; BÜCHLER, M.; JEDLITSCHKY, G.; LEIER, I. und KEPPLER, D.: Expression of the MRP gene-encoded conjugate export pump in liver and its selective absence from the canalicular membrane in transport-deficient mutant hepatocytes. In: *J. Cell Biol.* 131 (1995), S. 137-150.
- McGRATH, T. und CENTER, M.S.: Adriamycin resistance in HL60 cells in the absence of detectable P-glycoprotein. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145 (1987), S. 1171-1176.
- MEIJER, O.C.; DE LANGE, E.C.; BREIMER, D.D.; DE BOER, A.G.; WORKEL, J.O. und DE KLOET, E.R.: Penetration of dexamethasone into brain glucocorticoid targets is enhanced in *mdr1A* P-glycoprotein knockout mice. In: *Endocrinology* 139 (1998), Nr. 4, S. 1789-1793.

- MERESSE, S.; DEHOUCQ, M.P.; DELORME, P.; BENSaid, M.; TAUBER, J.P.; DELBART, C.; FRUCHART, J.C. und CECHELLI, R.: Bovine brain endothelial cells express tight junctions and monoamine oxidase activity in long-term culture. In: *J. Neurochem.* 53 (1989), Nr. 5, S. 1363-1371.
- MEYER, J.; MISCHECK, U.; VEHYL, M.; HENZEL, K. und GALLA, H.-J.: Blood-brain barrier characteristic enzymatic properties in cultured brain capillary endothelial cells. In: *Brain Research* 514 (1990), S. 305-309.
- MILLER, D.S.; MASEREEUW; HENSON, J. und KARNAKY, K.J.R.: Excretory transport of xenobiotics by dogfish shark rectal gland tubules. In: *Am. J. Physiol.* 275 (1998), S. R697-R705.
- MILLER, D.W.; BATRAKOVA, E.V. und KABANOV, A.: Inhibition of multidrug resistance-associated protein (MRP) functional activity with pluronic block copolymers. In: *Pharm. Res.* 16 (1999), Nr. 3, S. 396-401.
- MINN, A.; GHERSI-EGEA, J.F.; PERRIN, R.; LEININGER, B. und SIEST, G.: Drug metabolizing enzymes in the brain and cerebral microvessels. In: *Brain Res. Rev.* 16 (1991), S. 65-82.
- MIRSKI, S.E.; GERLACH, J.H. und COLE, S.P.C.: Multidrug resistance in a human small lung cancer cell line selected in adriamycin. In: *Cancer Res.* 47 (1987), S. 2594-2598.
- MISCHECK, U.; MEYER, J. und GALLA, H.-J.: Characterization of γ -glutamyl transpeptidase activity of cultured endothelial cells from porcine brain capillaries. In: *Cell Tissue Res.* 256 (1989), S. 221-226.
- MIZUGUCHI, H.; HASHIOKA, Y.; FUJII, A.; UTOGUCHI, N.; KUBO, K.; NAKAGAWA, S.; BABA, A. und MAYUMI, T.: Glial extracellular matrix modulates γ -glutamyl transpeptidase activity in cultured bovine brain capillary and bovine aortic endothelial cells. In: *Brain Res.* 651 (1994), S. 155-159.
- MRSULJA, B.B.; MRSULJA, B.J.; FUJIMOTO, T.; KLATZO, I. und SPATZ, M.: Isolation of brain capillaries: a simplified technique. In: *Brain Res.* 110 (1976), S. 361-365.
- MÜLLER, M.; MEIJER, C.; ZAMAN, G.J.; BORST, P.; SCHEPER, R.J.; MULDER, N.H.; DE VRIES, E.G.E. und JANSEN, P.L.M.: Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994), S. 13033-13037.
- MÜLLER, M. und JANSEN, P.L.M.: Molecular aspects of hepatobiliary transport. In: *Am. J. Physiol.* 272 (1997), S. G1285-1301.

N

- NISHINO, J.I.; SUZUKI, H.; SUGIYAMA, D.; KITAZAWA, T.; ITO, K.; HANANO, M. und SUGIYAMA, Y.: Transepithelial transport of organic anions across the choroid plexus: possible involvement of organic anion transporter and multidrug resistance-associated protein. In: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290 (1999), S. 289-294.

O

- OLDENDORF, W.H.: Measurement of radiolabelled substances using a tritiated water internal standard. In: *Brain Res.* 24 (1970), S. 372-376.
- OLDENDORF, W.H.: Lipid solubility and drug penetration of the blood-brain barrier. In: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 147 (1974), S. 813-816.
- ORLOWSKI, M. und MEISTER, A.: γ -Glutamyl-p-nitroanilid: a new convenient substrate for determination and study of L- and D- γ -glutamyltranspeptidase activities. In: *Biochim. Biophys. Acta* 73 (1963), S. 679-681.
- ORLOWSKI, M. und MEISTER, A.: The γ -glutamyl cycle: a possible transport system for amino acids. In: *Proc. N. A. S.* 67 (1970), Nr. 3, S. 1248-1255.
- ORLOWSKI, M.; SESSA, G. und GREEN, J.: γ -Glutamyl transpeptidase in brain capillaries: possible site of a blood-brain barrier for amino acids. In: *Science* 184 (1974), S. 66-68.
- OTTESEN, E.A. und CAMPBELL, W.C.: Ivermectin in human medicine. In: *J. Antimicrobial Chemotherapy* 34 (1994), S. 195-203.
- OUDE ELFERINK, R.P.J. und JANSEN, P.L.M.: The role of the canalicular multispecific organic anion transporter in the disposal of endo- and xenobiotics. In: *Pharm. Ther.* 64 (1994), S. 77-97.
- OUDE ELFERINK, R.P.J.; MEIJER, D.K.; KUIPERS, F.; JANSEN, P.L.M.; GROEN, A.K. und GROOTHUIS, G.M.: Hepathobiliary secretion of organic compounds; molecular mechanisms of membrane transport. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1241 (1995), S. 215-268.

P

- PANULA, P.; JOÓ, F. und RECHARD, L.: Evidence for the presence of viable endothelial cells in culture derived from dissociated rat brain. In: *Experientia* 34 (1978), Nr. 1, S. 95-97.
- PAPPENHEIMER, J.R.; RENKIN, E.M. und BORRERO, L.M.: Filtration, diffusion and molecular sieving through peripheral capillary membranes. In: *Am. J. Physiol.* 183 (1951), S. 221-234.
- PARDRIDGE, W.M.; EISENBERG, J. und YAMADA, T.: Rapid sequestration and degeneration of somatostatin analogues by isolated brain microvessels. In: *J. Neurochem.* 44 (1985a), S. 1178-1184.
- PARDRIDGE, W.M.; EISENBERG, J. und YANG, J.: Human blood-brain barrier insulin receptor. In: *J. Neurochem.* 44 (1985b), S. 1771-1778.
- PARDRIDGE, W.M.: Brain drug delivery and blood-brain barrier transport. In: *Drug Delivery* 3 (1996), S. 99-115.
- PARDRIDGE, W.M.; GOLDEN, P.L.; KANG, Y.-S. und BICKEL, U.: Brain microvascular and astrocyte localization of P-glycoprotein. In: *J. Neurochem.* 68 (1997), S. 1278-1285.
- PARDRIDGE, W.M.: Blood-brain barrier carrier-mediated transport and brain metabolism of amino acids. In: *Neurochem. Res.* 23 (1998), Nr. 5, S. 635-644.
- PATEL, Y.C.; RAO, K. und REICHLIN, S.: Somatostatin in human cerebrospinal fluid. In: *N. Engl. J. Med.* 296 (1977), S. 529-533.

- PATEL, Y.C.: Multiple forms of immunoreactive somatostatin: comparison of distribution in neural and non-neural tissues and portal plasma of the rat. In: *Endocrinology* 109 (1981), S. 1943-1949.
- PATEL, Y.C.: General aspects of the biology and function of somatostatin. In: WEIL, C.: Basic and clinical aspects of neuroscience . Bd. 4. Springer Verlag, 1992, S. 1-16
- PAUL, A.J.; TRANQUILLI, W.J.; SEWARD, R.L.; TODD, K.S. und DIPIETRO, J.A.: Clinical observations in Collies given ivermectin orally. In: *Am. J. Vet. Res.* 48 (1987), S. 684-686.
- PAULUSMA, C.C.; BOSMA, P.J.; ZAMAN, G.J.R.; BAKKER, C.T.M.; OTTER, M.; SCHEFFER, G.L.; SCHEPER, R.J.; BORST, P. und OUDE ELFERINK, R.P.J.: Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. In: *Science* 271 (1996), S. 1126-1128.
- PAULUSMA, C.C. und OUDE ELFERINK, R.P.J.: The canalicular multispecific organic anion transporter and conjugated hyperbilirubinemia in rat and man. In: *J. Mol. Med.* 75 (1997), S. 420-428.
- PERRIN, R.; MINN, A.; GHERSI-EGEA, J.F.; GRASSIOT, M.C. und SIEST, G.: Distribution of cytochrom P450 activities towards alkoxyresorufin derivatives in rat brain regions, subcellular fractions and isolated cerebral microvessels. In: *Biochem. Pharmacol.* 40 (1990), Nr. 9, S. 2145-2151.
- POULIOT, J.F.; L'HEUREUX, F.; LIU, Z.; PRICHARD, R.K. und GEORGES, E.: Reversal of P-glycoprotein-associated multidrug resistance by ivermectin. In: *Biochem. Pharmacol.* 53 (1997), S. 17-25.
- PULLIAM, J.D.; SEWARD, R.L.; HENRY, R.T. und STEINBERG, S.A.: Investigating ivermectin toxicity in collies. In: *Vet. Med.* 80 (1985), S. 33-40.

R

- RADERER, M. und SCHEITHAUER, W.: Clinical trials of agents that reverse multidrug resistance. A literature review. In: *Cancer* 72 (1993), S. 3553-3563.
- RAO, V.V.; DAHLHEIMER, J.L.; BARDGETT, M.E.; SYNDER, A.Z.; FINCH, R.A.; SARTORELLI, A.C. und PIWNICA-WORMS, D.: Choroid plexus epithelial expression of MDR1 P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein contribute to the blood-cerebrospinal-fluid drug permeability barrier. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999), S. 3900-3905.
- REED, D.J.: Drug transport into the central nervous system. In: GLASER, G.H.; PENTRY, J.K. und WOODBURY, D.M.: Antiepileptic drugs: mechanisms of action. New York: Raven Press, 1980, S. 199-205
- REESE, T.S. und KARNOVSKY, M.J.: Fine struktural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. In: *J. Cell Biol.* 34 (1967), S. 207-217.
- REEVE, J.G.; RABBITS, P.H. und TWENTYMAN, P.R.: Non P-glycoprotein-mediated multidrug resistance with reduced EGF receptor expression in a human large cell lung cancer cell line. In: *Br. J. Cancer* 61 (1990), S. 851-855.

- REGINA, A.; KOMAN, A.; PICIOTTI, M.; EL HAFNY, B.; CENTER, M.S.; BERGMANN, R.; COURAUD, P.O. und ROUX, F.: Mrp 1 multidrug resistance-associated protein and P-glycoprotein expression in rat brain microvessel endothelial cells. In: *J. Neurochem.* 71 (1998), S. 705-715.
- REICHLIN, S.: Somatostatin. In: *N. Engl. J. Med.* 309 (1983), S. 1495-1501, 1556-1563.
- REUBI, J.C.; KVOLS, L.; KRENNING, E. und LAMBERTS, S.W.J.: Distribution of somatostatin receptors in normal and tumor tissue. In: *Metabolism [Suppl 2]* 39 (1990), S. 78-81.
- RIORDAN, J.R. ROMMENS, J.M. und KEREM, B.S.: Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. In: *Science* 245 (1989), S. 1066-1073.
- RISAU, W.; DINGLER, A.; ALBRECHT, U.; DEHOUCQ, M. und CECCELLE, R.: Blood-brain barrier pericytes are the main source of γ -glutamyltranspeptidase activity in brain capillaries. In: *J. Neurochem.* 58 (1992), S. 667-672.
- ROELOFSEN, H.; BAKKER, C.T.; SCHOEMAKER, B.; HEIJN, M.; JANSEN, P.L.M. und ELFERINK, R.P.: Redistribution of canalicular organic anion transport activity in isolated and cultured rat hepatocytes. In: *Hepatology* 21 (1995), Nr. 6, S. 1649-1657.
- ROELOFSEN, H.; MÜLLER, M. und JANSEN, P.L.M.: Regulation of organic anion transport in the liver. In: *Yale J. Biol. Med.* 70 (1997a), S. 435-445.
- ROELOFSEN, H.; VOS, T.A.; SCHIPPERS, I.J.; KUIPERS, F.; KONING, H.; MOSHAGE, H.; JANSEN, P.L.M. und MÜLLER, M.: Increased levels of the multidrug resistance protein in lateral membranes of proliferating hepatocyte-derived cells. In: *Gastroenterology* 112 (1997b), S. 511-521.
- ROSE, J.M.; PECKHAM, S.L.; SCISM, J.L. und AUDUS, K.L.: Evaluation of the role of p-glycoprotein in ivermectin uptake by primary cultures of bovine brain microvessel endothelial cells. In: *Neurochem. Res.* 23 (1998), Nr. 2, S. 203-209.
- ROULET, A.; PUEL, O.; GESTA, S.; DRAG, M.; SOLL, M.; ALVINERIE, M. und PINEAU, T.: MDR pharmacogenetics in dog - Molecular basis of antiparasitic drug sensitivity (Ivermectin) in colley dog. In: *Abstract Book des 3. FEBS advanced lecture course: ABC proteins* (2001), S. 137.
- RUBIN, L.L.; HALL, D.E.; PARTER, S.; BARBU, K.; CANNON, C.; HORNER, H.C.; JANATPOUR, M.; LIAW, C.W.; MANNING, K.; MORALES, J.; TANNER, L.I.; TOMASELLI, K.J. und BARD, F.: A cell culture model of the blood-brain barrier. In: *J. Cell. Biol.* 115 (1991), Nr. 6, S. 1725-1735.
- RUBINOW, D.R.; DAVIS, C.L. und POST, R.M.: Somatostatin in neuropsychiatric disorder. In: WEIL, C.: Basic and clinical aspects of neuroscience. Bd. 4. Springer Verlag, 1992, S. 29-42

S

- SAKATA, A.; TAMAI, I.; KAWAZU, K.; DEGUCHI, Y.; OHNISHI, T.; SAHEKI, A. und TSUJI, A.: In vivo evidence for ATP-dependent and P-glycoprotein-mediated transport of cyclosporin A at the blood-brain-barrier. In: *Biochem. Pharmacol.* 48 (1994), Nr. 10, S. 1989-1992.
- SCHAUB, T.P.; KARTENBECK, J.; KÖNIG, J.; VOGEL, O.; WITZGALL, R.; KRIZ, W. und KEPLER, D.: Expression of the conjugate export pump encoded by the mrp2 gene in the apical membrane of kidney proximal tubules. In: *J. Am. Soc. Nephrol.* 8 (1997), S. 1213-1221.

- SCHEFFER, G.; KOOL, M.; HEIJN, M.; DE HAAS, M.; PIJNENEBORG, A.; WIJNHOLDS, J.; VAN HELVOORT, A.; DE JONG, M.; HOOIJBERG, J.; MOL, C.; VAN DER LINDEN, M.; DE VREE, J.; VAN DER VALK, P.; OUDE ELFERINK, R.P.; BORST, P. und SCHEPER, R.: Specific detection of multidrug resistance proteins MRP1, MRP2, MRP3, MRP5 and MDR3 P-glycoprotein with a panel of monoclonal antibodies. In: *Cancer Research* 60 (2000), S. 5269-5277.
- SCHINKEL, A.H.; SMIT, J.J., VAN TELLINGEN, O.; BEIJNEN, J.H.; WAGENAAR, E.; VAN DEEMTER, L.; MOL, C.A.; VAN DER VALK, M.A.; ROBANUS-MAANDAG, E.C. und TRIELE, H.P.: Disruption of the mouse *mdr 1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. In: *Cell* 77 (1994), S. 491-502.
- SCHINKEL, A.H.; WAGENAAR, E.; VAN DEEMTER, L.; MOL, C.A. und BORST, P.: Absence of the *mdr1a* P-glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin and cyclosporin A. In: *J. Clin. Invest.* 96 (1995), S. 1698-1705.
- SCHINKEL, A.H.; WAGENAAR, E.; MOL, C.A.A.M. und VAN DEEMTER, L.: P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. In: *J. Clin. Invest.* 97 (1996), Nr. 11, S. 2517-2524.
- SCHMITZ, J.; PREISER, H.; MAESTRACCI, D.; GHOSH, B.K.; CERDA, J.J. und CRANE, R.K.: Purification of the human intestinal brush border membrane. In: *Biochim. Biophys. Acta* 323 (1973), S. 98-112.
- SCHRAMM, U.; FRICKER, G.; WENGER, R. und MILLER, D.S.: P-glycoprotein-mediated secretion of a fluorescent cyclosporin analogue by teleost renal proximal tubules. In: *Am. J. Physiol.* 268 (1995), S. F46-F52.
- SEELIG, A.; GOTTSCHLICH, R. und DEVANT, R.M.: A method to determine the ability of drugs to diffuse through the blood-brain barrier. In: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91 (1994), S. 68-72.
- SEELIG, A.: A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein. In: *Eur. J. Biochem.* 251 (1998), S. 252-261.
- SEETHARAMAN, S.; BARRAND, M.A.; MASKELL, L. und SCHEPER, R.J.: Multidrug resistance-related transport proteins in isolated human brain microvessels and in cells cultered from these isolates. In: *J. Neurochem.* 70 (1998), S. 1151-1159.
- SEWARD, R.L.: Reactions in dogs given ivermectin. In: *J. of the American Veterinary Medical Association* 183 (1983), Nr. 5, S. 493.
- SHOTTON, D.M. und WHITE, N.: Confocal scanning microscopy: three-dimensional biological imaging. In: *TIBS* 14 (1989), S. 435-439.
- SIKOTOS, A.N. und FLEISCHER, S.: Isolation of highly purified human and bovine brain endothelial cells and nuclei and their phospholipid composition. In: *Lipids* 4 (1968), Nr. 3, S. 234-239.
- SILVERMAN, J.A. und THORGEIRSSON, S.S.: Regulation and function of the multidrug resistance genes in liver. In: *Prog. Liver Dis.* 13 (1995), S. 101-123.
- SLATER, L.M.; SWEET, P.; STUPECKY, M. und GUPTA, S.: Cyclosporin A reverses vincristine and daunorubicin resistance in acute lymphatic leukemia in vitro. In: *J. Clin. Invest.* 77 (1986), S. 1405-1408.

- SPARREBOOM, A.; VAN ASPEREN, J.; MAYER, U.; SCHINKEL, A.H.; SMIT, J.W.; MEIJER, D.K.; BORST, P.; NOOIJEN, W.J.; BEIJNEN, J.H. und VAN TELLINGEN, O.: Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. In: *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* 94 (1997), S. 2031-2035.
- SPATZ, H.: Die Bedeutung der vitalen Färbung für die Lehre vom Stoffaustausch zwischen dem Zentralnervensystem und dem übrigen Körper. In: *Arch. Psychiatr. Nervenkr.* 101 (1933), S. 267-358.
- SPATZ, M.; BEMBRY, J.; DODSON, R.F.; HERVONEN, H. und MURRAY, M.R.: Endothelial cells cultures derived from isolated cerebral microvessels. In: *Brain Res.* 191 (1980), S. 577-582.
- SPECTOR, R. und JOHNSON, C.: The mammalian choroid plexus. In: *Sci. Am.* 261 (1989), S. 68-74.
- STINS, M.F.; PRASADARAO, N.V.; IBRIC, L.; WASS, C.A.; LUCKETT, P. und KIM, K.S.: Binding characteristics of S fimbriated escherichia coli to isolated brain microvascular endothelial cells. In: *Am. J. Pathology* 145 (1994), Nr. 5, S. 1228-1236.
- SUZUKI, H.; TERASAKI, T. und SUGIYAMA, Y.: Role of efflux transport across the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier on the disposition of xenobiotics in the central nervous system. In: *Adv. Drug Deliv. Rev.* 25 (1997), S. 257-285.

T

- TAKAKURA, Y.; AUDUS, K.L. und BORCHARDT, R.T.: Blood-brain barrier: transport studies in isolated brain capillaries and in cultured brain endothelial cells. In: *Adv. Pharmacol.* 22 (1991), S. 137-165.
- TAKASATO, Y.; RAPOPORT, S.I. und SMITH, Q.R.: An in situ brain perfusion technique to study cerebrovascular transport in the rat. In: *Am. J. Physiol.* 247 (1984), S. H484-493.
- TAMAI, I. und TSUJI, A.: Drug delivery through the blood-brain barrier. In: *Adv. Drug Deliv. Rev.* 19 (1996), S. 401-424.
- TAO-CHEN, J.H. und BRIGHTMAN, M.W.: Development of membrane interactions between endothelial cells and astrocytes in vitro. In: *Int. J. Dev. Neurosci.* 6 (1988), S. 25-37.
- TEIFEL, M. und FRIEDEL, P.: Establishment of the permanent microvascular endothelial cell line PBMEC/C1-2 from porcine brains. In: *Exper. Cell. Res.* 228 (1996), S. 50-57.
- TERASAKI, T.; DEGUCHI, Y.; SATO, H.; HIRAI, K. und TSUJI, A.: In vivo transport of a dynorphin-like analgesic peptide, E 2078, through the blood-brain barrier: an application of microdialysis. In: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 251 (1991), S. 815-820.
- TERASAKI, T. und TSUJI, A.: Drug delivery to the brain utilizing blood-brain barrier transport systems. In: *J. Controlled Release* 29 (1994), S. 163-169.
- TERASAKI, T.; MIZUKUCHI, H.; ITOHO, C.; TAMAI, I.; LEMAIRE, M. und TSUJI, A.: Hepatic uptake of octreotide, a long-acting somatostatin analogue, via a bile acid transport system. In: *Pharm. Res.* 12 (1995), S. 11-16.

- THEWS, G.; MUTSCHLER, G.; VAUPEL, P.: *Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Menschen*, 4. Aufl. Stuttgart: WVG, 1991, S. 33
- THIEBAUT, F.; TSURUO, T.; HAMADA, H. GOTTESMANN, M.M.; PASTAN, I. und WILLINGHAM, M.C.: Cellular localization of the multidrug resistance gene product in normal human tissues. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987), S. 7735-7738.
- THÖLE, MARC: Arzneistofftransport an der Blut-Hirn Schranke: drug targeting mit liposomalen Konjugaten. In: *Dissertation* (2000).
- THOMAS, P.M.; COTE, G.J. und WOHLIK, N.: Mutations in the sulfonyleurea receptor gene in a familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. In: *Science* 268 (1995), S. 426-429.
- TOEWS, A.D.; KOLBER, A.R.; HAYWARD, J.; KRIGMAN, M.R. und MORELL, P.: Experimental lead encephalopathy in the suckling rat: concentration of lead in cellular fractions enriched in brain capillaries . In: *Brain Res.* 147 (1978), S. 131-138.
- TRIGUERO, D.; BUCIAK, J. und PARDRIDGE, W.: Capillary depletion method for quantification of blood-brain barrier transport of circulating peptides and plasma proteins. In: *J. Neurochem.* 54 (1990), S. 1882-1888.
- TSUJI, A.; TAMAI, I.; SAKATA, A.; TENDA, Y. und TERASAKI, T.: Restricted transport of cyclosporin A across the blood-brain barrier by a multidrug transporter, P-glycoprotein. In: *Biochem. Pharmacol.* 46 (1993), Nr. 6, S. 1096-1099.
- TUSNÁDY, G.E.; BAKOS, E.; VÁRADI, A. und SARKADI, B.: Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters. In: *FEBS Lett.* 402 (1997), S. 1-3.
- TWENTYMAN, P.R. und BLEEHEN, N.M.: Resistance modification by PSC-833, a novel non-immunosuppressive cyclosporin A. In: *Eur. J. Cancer* 27 (1991), S. 1639-1642.
- TWENTYMAN, P.R.: Cyclosporins as drug resistance modifiers. In: *Biochem. Pharmacol.* 43 (1992), S. 109-117.

U

- UEDA, K.; OKAMURA, N.; HIRAI, M.; TANIGAWARA, Y.; SAEKI, T.; KIOKA, N.; KOMANO, T. und HORI, R.: Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone and dexamethasone, but not progesterone. In: *J. Biol. Chem.* 267 (1992), S. 24248-24252.

V

- VAN ASPEREN, J.; MAYER, U.; VAN TELLINGEN, O. und BEIJNEN, J.H.: The functional role of P-glycoprotein in the blood-brain barrier. In: *J. Pharm. Sciences* 86 (1997), Nr. 8, S. 881-884.
- VAN AUBEL, R.A.; VAN KUIJCK, M.A.; KOENDERINK, J.B.; DEEN, P.M.T.; VAN OS, C.H. und RUSSEL, F.G.: Adenosin triphosphate-dependent transport of anionic conjugates by the rabbit multidrug resistance-associated protein mrp2 expressed in insect cells. In: *Molecular Pharmacology* 53 (1998), S. 1062-1067.

- VAN AUBEL, R.A.; HARTOG, A.; BINDELS, R.J.; VAN OS, C.H. und RUSSEL, F.G.: Expression and immunolocalization of multidrug resistance protein 2 in rabbit small intestine. In: *Eur. J. Pharmacol.* 400 (2000a), S. 195-198.
- VAN AUBEL, R.A.; MASEREEUW, R. und RUSSEL, F.G.: Molecular pharmacology of renal organic anion transporters. In: *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 279 (2000b), S. F216-F232.
- VAN BREE, J.B.; DE BOER, A.G.; DANHOF, M. und BREIMER, D.D.: Drug transport across the blood-brain barrier, I. Anatomical and physiological aspects. In: *Pharmaceutisch Weekblad Scientific edition* 14 (1992a), Nr. 5, S. 305-310.
- VAN BREE, J.B.; DE BOER, A.G.; DANHOF, M. und BREIMER, D.D.: Drug transport across the blood-brain barrier, II. Experimental techniques to study drug transport. In: *Pharmaceutisch Weekblad Scientific edition* 14 (1992b), Nr. 6, S. 338-348.
- VAN BREE, J.B.; DE BOER, A.G.; DANHOF, M. und BREIMER, D.D.: Drug transport across the blood-brain barrier, III. Mechanism and methods to improve drug delivery to the central nervous system. In: *Pharmacy world & science* 15 (1993), Nr. 1, S. 2-9.
- VORBRODT, A.W.; LOSSINSKY, A.S. und WISNIEWSKI, H.M.: Enzyme cytochemistry of blood-brain barrier (BBB) disturbances. In: *Acta Neuropathol. [Suppl]* 8 (1983), S. 43-57.

W

- WALTER, F.K.: Die allgemeinen Grundlagen des Stoffaustausches zwischen dem Zentralnervensystem und dem übrigen Körper. In: *Arch. Psychiatr. Nervenkr.* 101 (1930), S. 195-230.
- WANG, Q.; YANG, H.; MILLER, D.W. und ELMQUIST, W.F.: Effect of the P-glycoprotein inhibitor, cyclosporin A, on the distribution of rhodamin-123 to the brain: an in vivo microdialysis study in freely moving rats. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211 (1995), S. 719-726.
- WEBER, M.; MEHLER, M. und WOLLNY, E.: Isolation and partial characterization of a 56,000-dalton phosphoprotein phosphatase from the blood-brain barrier. In: *J. Neurochem.* 49 (1987), Nr. 4, S. 1050-1056.
- WELSH, M.J. und SMITH, A.E.: Molecular mechanism of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. In: *Cell* 73 (1993), S. 1251-1254.
- WHITE, F.P.; DUTTON, G.R. und NORENBURG, M.D.: Microvessels isolated from rat brain: localization of astrocyte processes by immunohistochemical techniques. In: *J. Neurochem.* 36 (1981), Nr. 1, S. 328-332.
- WIJNHOLDS, J.; DE LANGE, E.C.; SCHEFFER, G.L.; VAN DEN BERG, D.J.; MOL, C.A.; VAN DER VALK, M.; SCHINKEL, A.H.; SCHEPER, R.J.; BREIMER, D.D. und BORST, P.: Multidrug resistance protein 1 protects the choroid plexus epithelium and contributes to the blood-cerebrospinal fluid barrier. In: *J. Clin. Invest.* 105 (2000), S. 279-285.
- WILLIAMS, S.K.; GILLIS, J.F.; MATTHEWS, M.A.; WAGNER, R.C. und BITENSKY, M.W.: Isolation and characterization of brain endothelial cells: morphology and enzyme activity. In: *J. Neurochem.* 35 (1980), S. 374-381.

Y

- YAMADA, T.; NIINUMA, K.; LEMAIRE, M.; TERASAKI, T. und SUGIYAMA, Y.: Mechanism of the tissue distribution and biliary excretion of the cyclic peptide octreotide. In: *J. Pharmacol. Exper. Therap.* 279 (1996), Nr. 3, S. 1357-1364.
- YAMADA, T.; NIINUMA, K.; LEMAIRE, M.; TERASAKI, T. und SUGIYAMA, Y.: Carrier-mediated hepatic uptake of the cationic cyclopeptid, octreotid, in rats. In: *Drug Metabolism and Disposition* 25 (1997), Nr. 5, S. 536-543.
- YAMADA, T.; KATO, Y.; KUSUHARA, H.; LEMAIRE, M. und SUGIYAMA, Y.: Characterization of the transport of a cationic octapeptide, octreotide, in rat bile canalicular membrane: possible involvement of P-glycoprotein. In: *Biol. Pharm. Bull* 21 (1998), Nr. 8, S. 874-878.

Z

- ZAMAN, G.J.R.; VERSANTVOORT, C.H.M.; SMIT, J.J.M.; EIJDENS, E.W.; DE HAAS, M.; SMITH, A.J.; BROXTERMAN, H.J.; MULDER, N.H.; DE VRIES, E.G.; BAAS, F. und BORST, P.: Analysis of the expression of MRP, the gene for a new putative transmembrane drug transporter, in human multidrug resistant lung cancer cell lines. In: *Cancer Res.* 53 (1993), S. 1747-1750.
- ZAMAN, G.J.R.; FLENS, M.J.; VAN LEUSDEN, M.R.; DE HAAS, M.; MUELDER, H.S.; LANKELMA, J.; PINEDO, H.M.; SCHEPER, R.J.; BROXTERMAN, H.J. und BORST, P.: The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994), S. 8822-8826.
- ZHANG, Y.; HAN, H.; ELMQUIST, W.F. und MILLER, D.W.: Expression of various multidrug resistance-associated protein (MRP) homologues in brain microvessel endothelial cells. In: *Brain Research* 876 (2000), S. 148-153.
- ZLOKOVIC, B.V.; BEGLEY, D.J.; DJURICIC, B.M. und MITROVIC, D.M.: Measurement of solute transport in the perfused guinea pig brain. Method application to N-methyl- α -aminoisobutyric acid. In: *J. Neurochem.* 46 (1986), S. 1444-1451.
- ZLOKOVIC, B.V. und APUZZO, M.L.: Strategies to circumvent vascular barriers of the central nervous system. In: *Neurosurgery* 43 (1998), S. 877-888.